(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114846140 A
(43)申请公布日 2022.08.02

(21)申请号 202080088666.0

(22)申请日 2020.12.22

(66)本国优先权数据
PCT/CN2019/127972 2019.12.24 CN
PCT/CN2020/107002 2020.08.05 CN

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.06.20

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2020/087697 2020.12.22

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/130266 EN 2021.07.01

(71)申请人 豪夫迈·罗氏有限公司
地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 高璐 朱永红 S·奥特森 H·米勒 周雪 J·E·F·布莱辛 金玉燕 卜擎燕 G·蒂亚吉

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所 11247
专利代理师 陈润杰 黄革生

(51)Int.Cl.
C12N 15/113(2006.01)
A61K 31/4375(2006.01)
A61K 31/506(2006.01)
A61K 31/519(2006.01)
A61K 31/5377(2006.01)
A61K 31/554(2006.01)
A61P 31/12(2006.01)
A61K 31/7064(2006.01)
A61K 31/712(2006.01)
A61P 31/20(2006.01)
A61K 31/522(2006.01)
A61K 31/675(2006.01)
A61K 31/683(2006.01)
A61K 47/54(2006.01)

权利要求书21页 说明书118页
序列表37页 附图47页

(54)发明名称

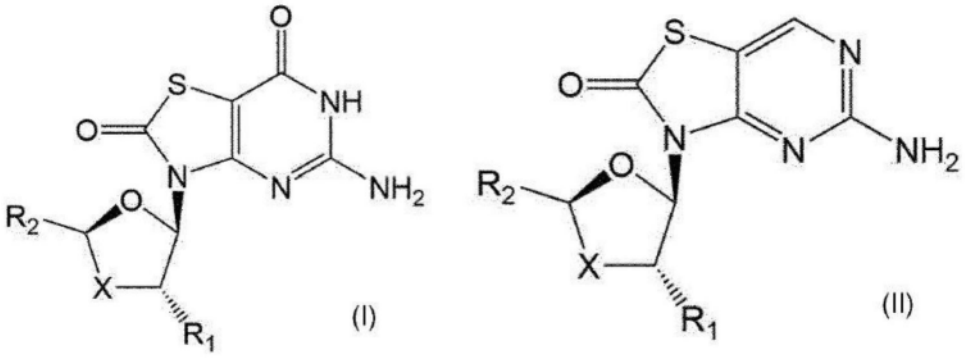
用于治疗HBV的靶向HBV的治疗性寡核苷酸和TLR7激动剂的药物组合

(57)摘要

本发明涉及用于治疗乙型肝炎病毒感染的组合物和方法。特别地，本发明涉及用于治疗慢性乙型肝炎患者的组合疗法，所述组合疗法包括施用靶向HBV的治疗性寡核苷酸和TLR7激动剂。

CN 114846140 A

1.一种药物组合,其包含以下项或由以下项组成:治疗性寡核苷酸和式(I)或式(II)的TLR7激动剂:



其中X为CH_2或S;

对于式(I),R_1为-OH或-H,并且R_2为1-羟基丙基或羟基甲基,

对于式(II),R_1为-OH或-H或乙酰氧基,并且R_2为1-乙酰氧基丙基或1-羟基丙基或1-羟基甲基或乙酰氧基(环丙基)甲基或乙酰氧基(丙炔-1-基)甲基,

或其药用盐、对映体或非对映体。

2.根据权利要求1所述的药物组合,其中所述治疗性寡核苷酸为RNAi寡核苷酸。

3.根据权利要求2所述的药物组合,其中所述RNAi寡核苷酸为靶向HBV的寡核苷酸(RNAi ID NO:1)。

4.根据权利要求2或3所述的药物组合,其中所述RNAi寡核苷酸为靶向HBsAg mRNA的寡核苷酸(RNAi ID NO:2)。

5.根据权利要求2至4中任一项所述的药物组合,其中所述RNAi寡核苷酸为减少HBsAg mRNA的表达的寡核苷酸(RNAi ID NO:3)。

6.根据权利要求2至5中任一项所述的药物组合,其中所述RNAi寡核苷酸为包含长度为19个至30个核苷酸的反义链的寡核苷酸,其中所述反义链包含与HBsAg mRNA的如ACAANAAUCCUCACAAUA(SEQ ID NO:33)所示的序列互补的区(RNAi ID NO:4)。

7.根据权利要求2至5中任一项所述的药物组合,其中所述RNAi寡核苷酸为用于减少乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)mRNA的表达的寡核苷酸,所述寡核苷酸包含长度为19个至30个核苷酸的反义链,其中所述反义链包含与HBsAg mRNA的如ACAANAAUCCUCACAAUA(SEQ ID NO:33)所示的序列互补的区(RNAi ID NO:5)。

8.根据权利要求6或7所述的药物组合,其中所述RNAi寡核苷酸进一步包含长度为19个至50个核苷酸的正义链,其中所述正义链与所述反义链形成双链体区。

9.根据权利要求8所述的药物组合,其中所述正义链包含与如UUNUUGUGAGGAUUN(SEQ ID NO:34)所示的序列互补的区。

10.根据权利要求8或9所述的药物组合,其中所述正义链包含与如5'-UUAUUGUGAGGAUUNUUGUC(SEQ ID NO:35)所示的序列互补的区。

11.根据权利要求9所述的药物组合,其中所述反义链包含如UUAUUGUGAGGAUUNUUGUCGG(SEQ ID NO:36)所示的序列。

12.根据权利要求9所述的药物组合,其中所述反义链由如UUAUUGUGAGGAUUCUUGUCGG(SEQ ID NO:37)所示的序列组成。

13.根据权利要求9所述的药物组合,其中所述反义链由如UUAUUGUGAGGAUUUUUGUCGG(SEQ ID NO:38)所示的序列组成。

14.根据权利要求8至12中任一项所述的药物组合,其中所述正义链包含如ACAANAAUCCUCACAAUAA(SEQ ID NO:39)所示的序列。

15.根据权利要求8至14中任一项所述的药物组合,其中所述正义链包含如GACAANAAUCCUCACAAUAAGCAGCCGAAAGGCUGC(SEQ ID NO:40)所示的序列。

16.根据权利要求8至14中任一项所述的药物组合,其中所述正义链由如GACAAAAAUCCUCACAAUAAGCAGCCGAAAGGCUGC(SEQ ID NO:41)所示的序列组成。

17.根据权利要求8至14中任一项所述的药物组合,其中所述正义链由如GACAAGAAUCCUCACAAUAAGCAGCCGAAAGGCUGC(SEQ ID NO:42)所示的序列组成。

18.根据权利要求2至5中任一项所述的药物组合,其中所述RNAi寡核苷酸为用于减少乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)mRNA的表达的寡核苷酸,所述寡核苷酸包含与反义链形成双链体区的正义链,其中所述正义链包含如GACAAAAAUCCUCACAAUAAGCAGCCGAAAGGCUGC(SEQ ID NO:41)所示的序列,其中所述反义链包含如UUAUUGUGAGGAUUUUUGUCGG(SEQ ID NO:38)所示的序列,

其中所述反义链和所述正义链中的每一者包含一个或多个2'-氟和2'-O-甲基修饰的核苷酸以及至少一个硫代磷酸酯键,其中所述反义链的5'-核苷酸的糖的4'-碳包含磷酸类似物,并且其中所述正义链缀合至一个或多个N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)部分。

19.根据权利要求2至5中任一项所述的药物组合,其中所述RNAi寡核苷酸为用于减少乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)mRNA的表达的寡核苷酸,所述寡核苷酸包含与反义链形成双链体区的正义链,其中:

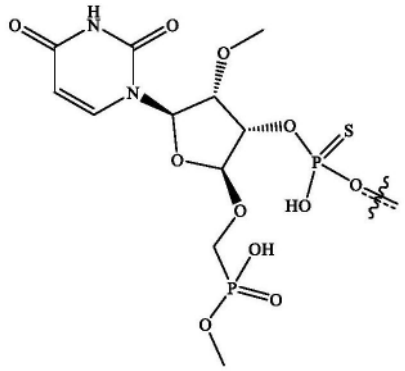
所述正义链包含如GACAAAAAUCCUCACAAUAAGCAGCCGAAAGGCUGC(SEQ ID NO:41)所示的序列,并且包含:在第3位、第8位至第10位、第12位、第13位和第17位处的2'-氟修饰的核苷酸;在第1位、第2位、第4位至第7位、第11位、第14位至第16位、第18位至第26位和第31位至第36位处的2'-O-甲基修饰的核苷酸;以及至少一个硫代磷酸酯核苷酸间键,其中所述正义链缀合至一个或多个N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)部分;并且

所述反义链包含如UUAUUGUGAGGAUUUUUGUCGG(SEQ ID NO:38)所示的序列,并且包含:在第2位、第3位、第5位、第7位、第8位、第10位、第12位、第14位、第16位和第19位处的2'-氟修饰的核苷酸;在第1位、第4位、第6位、第9位、第11位、第13位、第15位、第17位、第18位和第20位至第22位处的2'-O-甲基修饰的核苷酸;以及至少三个硫代磷酸酯核苷酸间键,其中所述反义链的5'-核苷酸的糖的4'-碳包含磷酸类似物。

20.根据权利要求19所述的药物组合,其中所述正义链包含在第1位和第2位处的核苷酸之间的硫代磷酸酯键。

21.根据权利要求19或20所述的药物组合,其中所述反义链包含核苷酸1与核苷酸2之间、核苷酸2与核苷酸3之间、核苷酸3与核苷酸4之间、核苷酸20与核苷酸21之间以及核苷酸21与核苷酸22之间的五个硫代磷酸酯键。

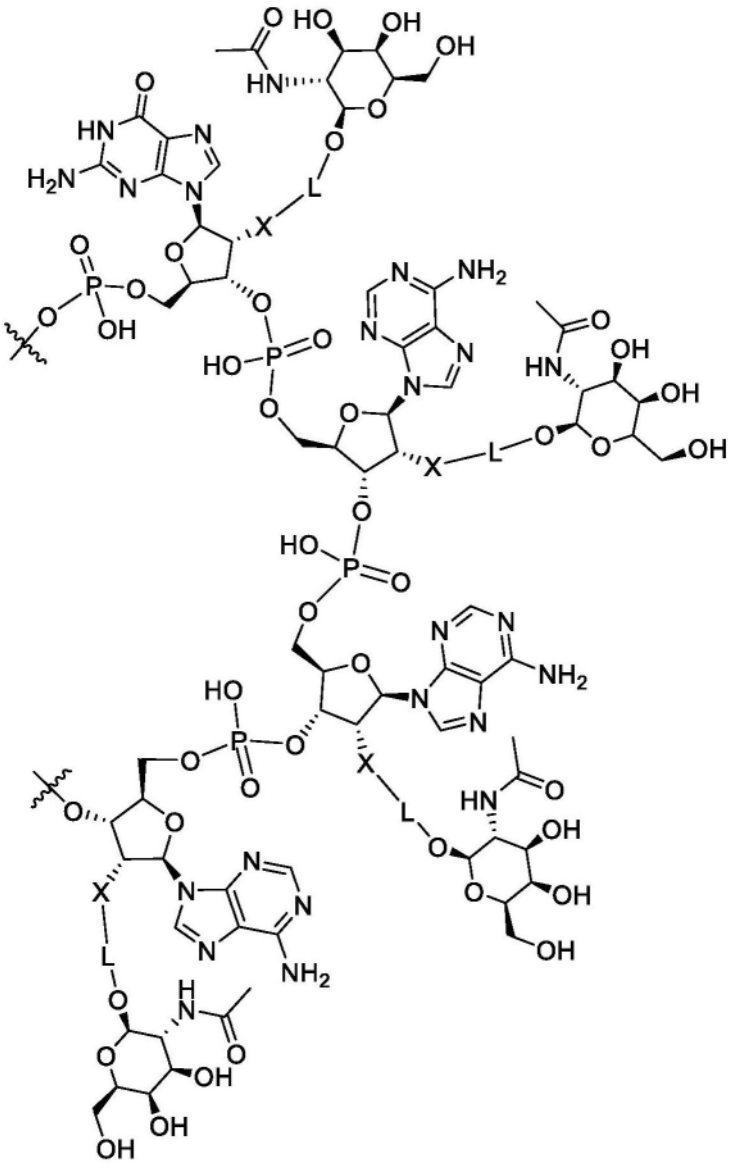
22.根据权利要求19至21中任一项所述的药物组合,其中所述反义链的所述5'-核苷酸具有以下结构:



23.根据权利要求19至22中任一项所述的药物组合,其中所述正义链上的-GAAA-序列的核苷酸中的一个或多个核苷酸缀合至单价GalNAc部分。

24.根据权利要求23所述的药物组合,其中所述正义链上的所述-GAAA-序列的所述核苷酸中的每个核苷酸缀合至单价GalNAc部分。

25.根据权利要求24所述的药物组合,其中-GAAA-基序包含以下结构:



,

其中:

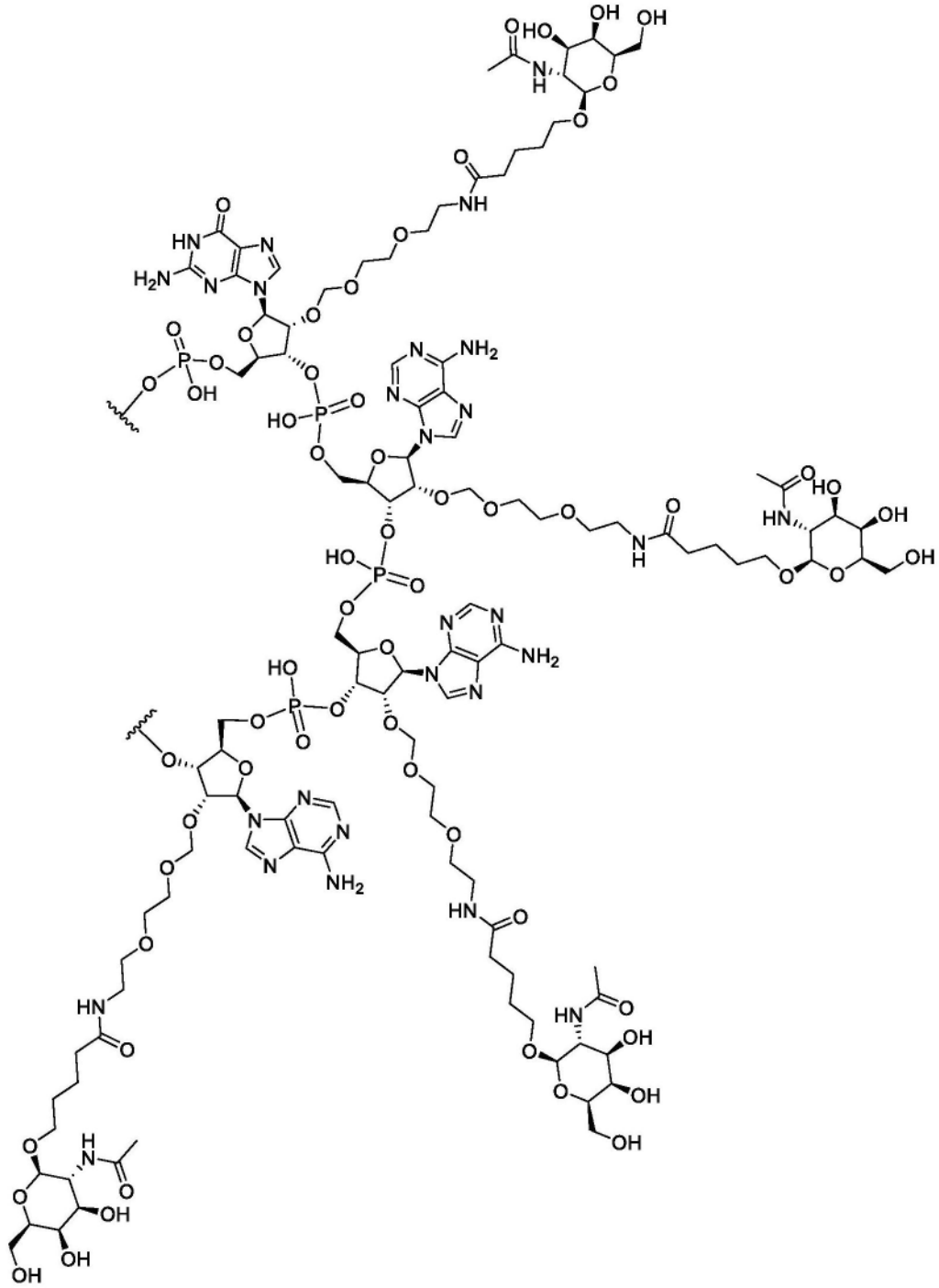
L代表键、点击化学柄、或长度为包含端值在内的1个至20个连续的、共价键合的原子的接头，所述接头选自由以下项组成的组：取代的和未取代的亚烷基、取代的和未取代的亚烯基、取代的和未取代的亚炔基、取代的和未取代的亚杂烷基、取代的和未取代的亚杂烯基、取代的和未取代的亚杂炔基以及它们的组合；并且

X为O、S或N。

26.根据权利要求25所述的药物组合，其中L为乙缩醛接头。

27.根据权利要求25或26所述的药物组合，其中X为O。

28.根据权利要求20所述的药物组合，其中所述-GAAA-序列包含以下结构：



29.根据权利要求8所述的药物组合，其中所述正义链在其3'-端包含如下所示的茎环：

S_1-L-S_2，其中S_1与S_2互补，并且其中L在S_1与S_2之间形成长度为至多6个核苷酸的环。

30.根据权利要求29所述的药物组合，其中L为四环。

31.根据权利要求29或30所述的药物组合，其中L在S_1与S_2之间形成长度为4个核苷酸的环。

32.根据权利要求29至31中任一项所述的药物组合，其中L包含如GAAA所示的序列。

33.根据权利要求29至32中任一项所述的药物组合，其中所述茎环的L的至多4个核苷酸各自缀合至单独的GalNAc。

34.根据权利要求6至16中任一项所述的药物组合，其中所述RNAi寡核苷酸包含至少一个经修饰的核苷酸。

35.根据权利要求34所述的药物组合，其中所述经修饰的核苷酸包含2'-修饰。

36.根据权利要求35所述的药物组合，其中所述2'-修饰是选自以下项的修饰：2'-氨基乙基、2'-氟、2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基和2'-脱氧-2'-氟-β-d-阿糖核酸。

37.根据权利要求6至16中任一项所述的药物组合，其中所述RNAi寡核苷酸的核苷酸中的所有核苷酸都是经修饰的核苷酸。

38.根据权利要求6至16中任一项所述的药物组合，其中所述RNAi寡核苷酸包含至少一个经修饰的核苷酸间键。

39.根据权利要求38所述的药物组合，其中所述至少一个经修饰的核苷酸间键为硫代磷酸酯键。

40.根据权利要求6至16中任一项所述的药物组合，其中所述反义链的5'-核苷酸的糖的4'-碳包含磷酸类似物。

41.根据权利要求6至16中任一项所述的药物组合，其中所述寡核苷酸的至少一个核苷酸缀合至靶向配体。

42.根据权利要求41所述的药物组合，其中所述靶向配体为N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)部分。

43.根据权利要求2至5中任一项所述的药物组合，其中所述RNAi寡核苷酸为用于减少乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)mRNA的表达的寡核苷酸，所述寡核苷酸包含与反义链形成双链体区的正义链，其中：

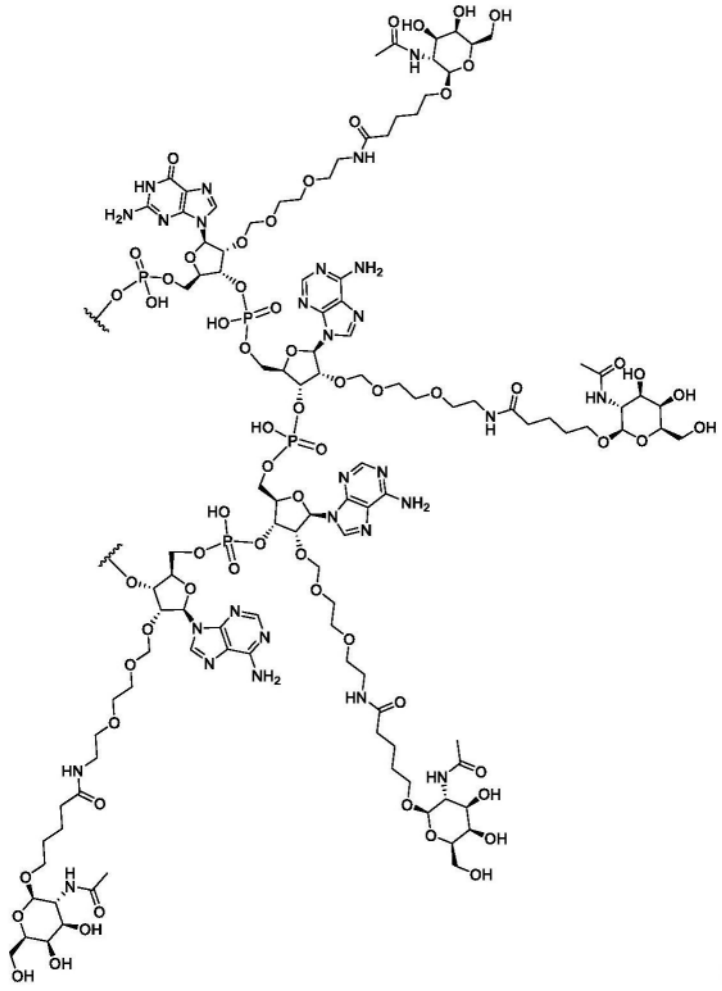
所述正义链由如GACAAAAAUCCUCACAAUAAGCAGCCGAAAGGCUGC(SEQ ID NO:41)所示的序列组成，并且包含：在第3位、第8位至第10位、第12位、第13位和第17位处的2'-氟修饰的核苷酸；在第1位、第2位、第4位至第7位、第11位、第14位至第16位、第18位至第26位和第31位至第36位处的2'-O-甲基修饰的核苷酸；以及在第1位和第2位处的核苷酸之间的硫代磷酸酯键，其中所述正义链上的所述-GAAA-序列的所述核苷酸中的每个核苷酸缀合至单价GalNac部分；并且

所述反义链由如UUAUUGUGAGGAUUUUUGUCGG(SEQ ID NO:38)所示的序列组成，并且包含在第2位、第3位、第5位、第7位、第8位、第10位、第12位、第14位、第16位和第19位处的2'-氟修饰的核苷酸；在第1位、第4位、第6位、第9位、第11位、第13位、第15位、第17位、第18位和第20位至第22位处的2'-O-甲基修饰的核苷酸；以及在第1位和第2位处的核苷酸之间、在第2位和第3位处的核苷酸之间、在第3位和第4位处的核苷酸之间、在第20位和第21位处的核苷酸之间以及在第21位和第22位处的核苷酸之间的硫代磷酸酯键，

其中所述反义链的5'-核苷酸的糖的4'-碳包含甲氧基膦酸酯(MOP)(RNAi ID NO:6)。

44.根据权利要求2至5中任一项所述的药物组合,其中所述RNAi寡核苷酸为用于减少乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)mRNA的表达的寡核苷酸,所述寡核苷酸包含与反义链形成双链体区的正义链,其中:

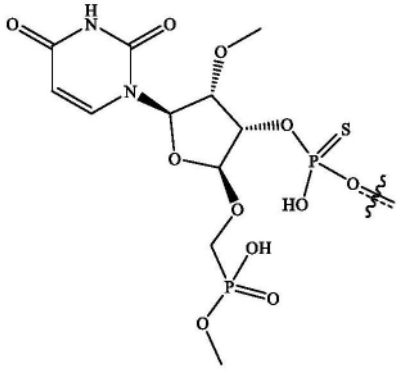
所述正义链包含如GACAAAAAUCCUCACAAUAAGCAGCCGAAAGGCUGC(SEQ ID NO:41)所示的序列,并且包含:在第3位、第8位至第10位、第12位、第13位和第17位处的2'-氟修饰的核苷酸;在第1位、第2位、第4位至第7位、第11位、第14位至第16位、第18位至第26位和第31位至第36位处的2'-O-甲基修饰的核苷酸;以及在第1位和第2位处的核苷酸之间的一个硫代磷酸酯核苷酸间键,其中所述正义链上的所述-GAAA-序列的所述核苷酸中的每个核苷酸缀合至单价GalNAc部分;其中所述-GAAA-序列包含以下结构:



并且

;

所述反义链包含如UUAUUGUGAGGAUUUUUGUCGG(SEQ ID NO:38)所示的序列,并且包含:在第2位、第3位、第5位、第7位、第8位、第10位、第12位、第14位、第16位和第19位处的2'-氟修饰的核苷酸;在第1位、第4位、第6位、第9位、第11位、第13位、第15位、第17位、第18位和第20位至第22位处的2'-O-甲基修饰的核苷酸;以及核苷酸1与核苷酸2之间、核苷酸2与核苷酸3之间、核苷酸3与核苷酸4之间、核苷酸20与核苷酸21之间以及核苷酸21与核苷酸22之间的五个硫代磷酸酯核苷酸间键,其中所述反义链的5'-核苷酸的糖的4'-碳具有以下结构:



(RNAi ID NO: 7)。

45.根据权利要求2至5中任一项所述的药物组合,其中所述RNAi寡核苷酸具有图29A所示的结构(RNAi ID NO:8)。

46.根据权利要求2至5中任一项所述的药物组合,其中所述RNAi寡核苷酸为寡核苷酸HBV(s)-219(RNAi ID NO:9)。

47.根据权利要求1所述的药物组合,其中所述治疗性寡核苷酸为长度为13个至22个核苷酸的GalNAc缀合的反义寡核苷酸,其具有与SEQ ID NO:1的从第1530位至第1602位的连续序列100%互补的至少12个核苷酸的连续核苷酸序列。

48.根据权利要求47所述的药物组合,其中所述连续核苷酸序列与选自由以下项组成的组的靶序列100%互补:SEQ ID NO:1的第1530位至第1598位、第1530位至第1543位、第1530位至第1544位、第1531位至第1543位、第1551位至第1565位、第1551位至第1566位、第1577位至第1589位、第1577位至第1591位、第1577位至第1592位、第1578位至第1590位、第1578位至第1592位、第1583位至第1598位、第1584位至第1598位、第1585位至第1598位和第1583位至第1602位。

49.根据权利要求47或48所述的药物组合,其中所述连续核苷酸序列的长度在12个至16个核苷酸之间。

50.根据权利要求47至49中任一项所述的药物组合,其中所述GalNAc缀合的反义寡核苷酸的所述连续核苷酸序列选自由以下项组成的组:

gcgtaaagagagg(SEQ ID NO:2);

gcgtaaagagaggt(SEQ ID NO:3);

cgcgtaaagagaggt(SEQ ID NO 4);

agaaggcacagacgg(SEQ ID NO 5);

gagaaggcacagacgg(SEQ ID NO 6);

agcgaagtgcacacgg(SEQ ID NO 7);

gaagtgcacacgg(SEQ ID NO 8);

gcgaagtgcacacgg(SEQ ID NO 9);

agcgaagtgcacacg(SEQ ID NO:10);

cgaagtgcacacg(SEQ ID NO 11);

aggtgaagcgaagtgc(SEQ ID NO:12);

aggtgaagcgaagtg(SEQ ID NO:13);

aggtgaagcgaagt(SEQ ID NO 14);和

gcagaggtgaagcgaagtgc(SEQ ID NO:29),或其药用盐。

51.根据权利要求47至50中任一项所述的药物组合,其中所述GalNAc缀合的反义寡核苷酸的所述连续核苷酸序列为式5'-F-G-F'-3'的缺口聚物,其中区F和F'独立地由2个至5个2'糖修饰的核苷酸组成并定义F和F'区的5'和3'端,并且G是能够募集RNase H的6个至10个DNA核苷之间的区。

52.根据权利要求51所述的药物组合,其中所述2'糖修饰的核苷独立地选自由以下项组成的组:2'-O-烷基-RNA、2'-O-甲基-RNA、2'-烷氧基-RNA、2'-O-甲氧基乙基-RNA、2'-氨基-DNA、2'-氟-DNA、2'-氟-ANA和LNA核苷。

53.根据权利要求51或52所述的药物组合,其中一个或多个所述2'糖修饰的核苷为MOE核苷。

54.根据权利要求51或52所述的药物组合,其中所述一个或多个所述2'糖修饰的核苷为LNA核苷。

55.根据权利要求54所述的药物组合,其中经修饰的LNA核苷选自氧基-LNA、氨基-LNA、硫代-LNA、cET和ENA。

56.根据权利要求54或55所述的药物组合,其中所述经修饰的LNA核苷为具有以下2'-4'桥-O-CH_2-的氧基-LNA。

57.根据权利要求56所述的药物组合,其中所述氧基-LNA为β-D-氧基-LNA。

58.根据权利要求54或55所述的药物组合,其中所述经修饰的LNA核苷为具有以下2'-4'桥-O-CH(CH_3)-的cET。

59.根据权利要求58所述的药物组合,其中所述cET为(S)cET,即6'(S)甲基-β-D-氧基-LNA。

60.根据权利要求54或55所述的药物组合,其中LNA为ENA,具有以下2'-4'桥-O-CH_2-CH_2-。

61.根据权利要求47至60中任一项所述的药物组合,其中所述GalNAc缀合的反义寡核苷酸的所述连续核苷酸序列选自由以下项组成的组:

GCGtaaagagaGG(SEQ ID NO:2);

GCGtaaagagAGG(SEQ ID NO:2);

GCGtaaagagaGGT(SEQ ID NO:3);

CGCgtaaagagaGGT(SEQ ID NO:4);

AGAaggcacagaCGG(SEQ ID NO:5);

GAGaaggcacagaCGG(SEQ ID NO:6);

AGCgaagtgcacaCGG(SEQ ID NO:7);

GAAgtgcacacGG(SEQ ID NO:8);

GAAgtgcacaCGG(SEQ ID NO:8);

GCGaagtgcacaCGG(SEQ ID NO:9);

AGCgaagtgcacACG(SEQ ID NO:10);

CGAagtgcacaCG(SEQ ID NO:11);

AGGtgaagcgaagTGC(SEQ ID NO:12);

AGGtgaagcgaaGTG(SEQ ID NO:13)；

AGgtgaagcgaAGTG(SEQ ID NO:13)；

AGGtgaagcgaAGT(SEQ ID NO:14)；和

GCAGAGgtgaagcgaAGTGC(SEQ ID NO:29)；

其中大写字母表示LNA核苷或MOE核苷，并且小写字母表示DNA核苷。

62.根据权利要求47至61中任一项所述的药物组合，其中所述连续核苷酸序列内至少50％的核苷间键为硫代磷酸酯核苷间键。

63.根据权利要求47至62中任一项所述的药物组合，其中所述GalNAc缀合的反义寡核苷酸的所述连续核苷酸序列内的所有核苷间键都为硫代磷酸酯核苷间键。

64.根据权利要求47至63中任一项所述的药物组合，其中所述GalNAc缀合的反义寡核苷酸的GalNAc缀合物为二价、三价或四价GalNAc簇。

65.根据权利要求64所述的药物组合，其中所述GalNAc缀合物选自图1B、图1D或图1J。

66.根据权利要求47至65中任一项所述的药物组合，其中所述GalNAc缀合的反义寡核苷酸的所述GalNAc缀合物和所述连续核苷酸序列通过包含两个、三个、四个或五个磷酸二酯连接的DNA核苷的PO接头共价连接。

67.根据权利要求66所述的药物组合，其中所述PO接头为所述反义寡核苷酸的一部分并由胞嘧啶和腺嘌呤(CA)的二核苷酸序列组成，所述二核苷酸序列具有至少两个磷酸二酯键，一个磷酸二酯键在C与A之间，并且一个磷酸二酯键连接至GalNAc簇。

68.根据权利要求47至67中任一项所述的药物组合，其中所述GalNAc缀合的反义寡核苷酸的长度为12个至18个核苷酸。

69.根据权利要求47至68中任一项所述的药物组合，其中所述GalNAc缀合的反义寡核苷酸选自由以下项组成的组：

5’-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$G$_s$^{m}C$_s$G$_s$t$_s$a$_s$a$_s$a$_s$g$_s$a$_s$g$_s$a$_s$G$_s$G-3’SEQ ID NO:15

5’-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$G$_s$^{m}C$_s$G$_s$t$_s$a$_s$a$_s$a$_s$g$_s$a$_s$g$_s$A$_s$G$_s$G-3’SEQ ID NO:15

5’-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$G$_s$^{m}C$_s$G$_s$t$_s$a$_s$a$_s$a$_s$g$_s$a$_s$g$_s$a$_s$G$_s$G$_s$T-3’SEQ ID NO:16

5’-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$^{m}C$_s$G$_s$^{m}C$_s$g$_s$t$_s$a$_s$a$_s$a$_s$g$_s$a$_s$g$_s$a$_s$G$_s$G$_s$T-3’SEQ ID NO:17

5’-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$A$_s$G$_s$A$_s$a$_s$g$_s$g$_s$c$_s$a$_s$c$_s$a$_s$g$_s$a$_s$^{m}C$_s$G$_s$G-3’SEQ ID NO:18

5’-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$G$_s$A$_s$G$_s$a$_s$a$_s$g$_s$g$_s$c$_s$a$_s$c$_s$a$_s$g$_s$a$_s$^{m}C$_s$G$_s$G-3’SEQ ID NO:19

5’-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$A$_s$G$_s$^{m}C$_s$g$_s$a$_s$a$_s$g$_s$t$_s$g$_s$c$_s$a$_s$c$_s$a$_s$^{m}C$_s$G$_s$G-3’SEQ ID NO:20

5’-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$G$_s$A$_s$A$_s$g$_s$t$_s$g$_s$c$_s$a$_s$c$_s$a$_s$^{m}c$_s$G$_s$G-3’SEQ ID NO:21

5’-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$G$_s$A$_s$A$_s$g$_s$t$_s$g$_s$c$_s$a$_s$c$_s$a$_s$^{m}C$_s$G$_s$G-3’SEQ ID NO:21

5’-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$G$_s$^{m}C$_s$G$_s$a$_s$a$_s$g$_s$t$_s$g$_s$c$_s$a$_s$c$_s$a$_s$^{m}C$_s$G$_s$G-3’SEQ ID NO:22

5’-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$A$_s$G$_s$^{m}C$_s$g$_s$a$_s$a$_s$g$_s$t$_s$g$_s$c$_s$a$_s$c$_s$A$_s$^{m}C$_s$G-3’SEQ ID NO:23

5’-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$^{m}C$_s$G$_s$A$_s$a$_s$g$_s$t$_s$g$_s$c$_s$a$_s$c$_s$a$_s$^{m}C$_s$G-3’SEQ ID NO:24

5’-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$A$_s$G$_s$G$_s$t$_s$g$_s$a$_s$a$_s$g$_s$^{m}c$_s$g$_s$a$_s$a$_s$g$_s$T$_s$G$_s$^{m}C-3’SEQ ID NO:25

5’-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$A$_s$G$_s$g$_s$t$_s$g$_s$a$_s$a$_s$g$_s$^{m}c$_s$g$_s$a$_s$A$_s$G$_s$T$_s$G-3’SEQ ID NO:26

5’-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$A$_s$G$_s$G$_s$t$_s$g$_s$a$_s$a$_s$g$_s$^{m}c$_s$g$_s$a$_s$a$_s$G$_s$T$_s$G-3’SEQ ID NO:26；和

5’-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$A$_s$G$_s$G$_s$t$_s$g$_s$a$_s$a$_s$g$_s$^{m}c$_s$g$_s$a$_s$A$_s$G$_s$T-3’SEQ ID NO:27

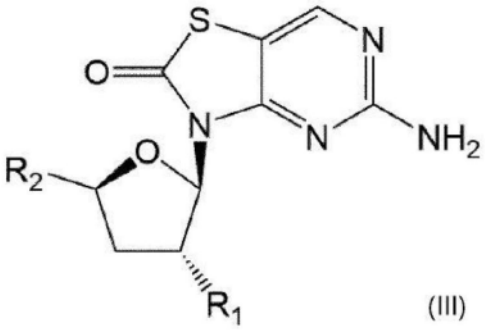
其中大写粗体字母表示β-D-氧基-LNA单元；小写字母表示DNA单元；下标“o”表示磷酸

二酯键;下标“s”表示硫代磷酸酯键;上标m表示含有5-甲基胞嘧啶碱基的DNA或β-D-氧基-LNA单元;GN2-C6表示具有C6接头的GalNAc2缀合物,或其药用盐。

70.根据权利要求47至69中任一项所述的药物组合,其中所述GalNAc缀合的反义寡核苷酸为5’-Fig1J-

$_{o}\underline{G_sC_sA_sG_sA_sg_sg_st_sg_sa_sa_sg_sc_sg_sa_s}\underline{A_sG_sT_sG_sC}$-3’(图2),其中带下划线的大写的带下划线的字母表示MOE单元;小写字母表示DNA单元;下标“o”表示磷酸二酯键;下标“s”表示硫代磷酸酯键。

71.根据权利要求1至70中任一项所述的药物组合,其中所述TLR7激动剂具有式(III):

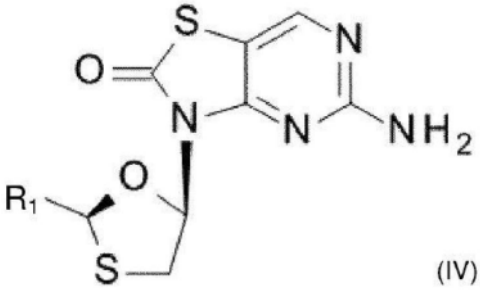


(III)

其中R_1为-OH或乙酰氧基,并且R_2为1-乙酰氧基丙基或1-羟基丙基或1-羟基甲基

或其药用盐、对映体或非对映体。

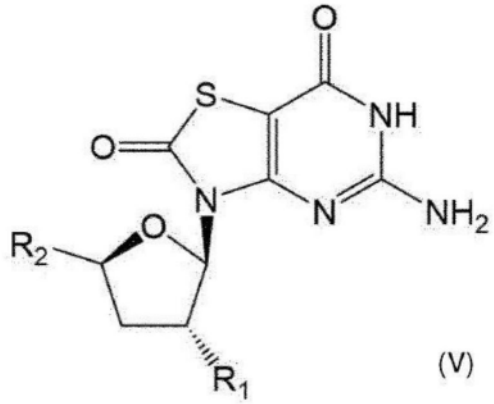
72.根据权利要求1至70中任一项所述的药物组合,其中所述TLR7激动剂具有式(IV):



(IV)

其中R_1为乙酰氧基(环丙基)甲基或乙酰氧基(丙炔-1-基)甲基。

73.根据权利要求1至70中任一项所述的药物组合,其中所述TLR7激动剂具有式(V):



(V)

其中R_1为-OH,并且R_2为1-羟基丙基或羟基甲基

或其药用盐、对映体或非对映体。

74.根据权利要求1至73中任一项所述的药物组合,其中所述TLR7激动剂选自由以下项

组成的组：

[(1S)-1-[(2S,4R,5R)-5-(5-氨基-2-氧代-噻唑并[4,5-d]嘧啶-3-基)-4-羟基-四氢呋喃-2-基]丙基]乙酸酯(CMP ID NO:VI)；

5-氨基-3-[(2R,3R,5S)-3-羟基-5-[(1S)-1-羟基丙基]四氢呋喃-2-基]-6H-噻唑并[4,5-d]嘧啶-2,7-二酮(CMP ID NO:VII)；

5-氨基-3-[(2R,3R,5S)-3-羟基-5-[(1S)-1-羟基丙基]四氢呋喃-2-基]噻唑并[4,5-d]嘧啶-2-酮(CMP ID NO:VIII)；

5-氨基-3-(3'-脱氧-β-D-呋喃核糖基)-3H-噻唑并[4,5-d]嘧啶-2-酮(CMP ID NO:IX)；

5-氨基-3-(2'-O-乙酰基-3'-脱氧-β-D-呋喃核糖基)-3H-噻唑并[4,5-d]嘧啶-2-酮(CMP ID NO:X)；

5-氨基-3-(3'-脱氧-β-D-呋喃核糖基)-3H,6H-噻唑并[4,5-d]嘧啶-2,7-二酮(CMP ID NO:XI)；

[(S)-[(2S,5R)-5-(5-氨基-2-氧代-噻唑并[4,5-d]嘧啶-3-基)-1,3-氧杂硫杂环戊烷-2-基]-环丙基-甲基]乙酸酯(CMP ID NO:XII)；和

(1S)-1-[(2S,5R)-5-(5-氨基-2-氧代-噻唑并[4,5-d]嘧啶-3-基)-1,3-氧杂硫杂环戊烷-2-基]丁-2-炔基]乙酸酯(CMP ID NO:XIII)；

或其药用盐、对映体或非对映体。

75.根据权利要求2至46和权利要求71至74中任一项所述的药物组合，其中包含RNAi寡核苷酸和TLR7激动剂的所述组合选自由以下组合组成的组：

RNAi ID NO:1和CMP ID NO:VI;RNAi ID NO:2和CMP ID NO:VI;RNAi ID NO:3和CMP ID NO:VI;RNAi ID NO:4和CMP ID NO:VI;RNAi ID NO:5和CMP ID NO:VI;RNAi ID NO:6和CMP ID NO:VI;RNAi ID NO:7和CMP ID NO:VI;RNAi ID NO:8和CMP ID NO:VI;RNAi ID NO:9和CMP ID NO:VI;

RNAi ID NO:1和CMP ID NO:VII;RNAi ID NO:2和CMP ID NO:VII;RNAi ID NO:3和CMP ID NO:VII;RNAi ID NO:4和CMP ID NO:VII;RNAi ID NO:5和CMP ID NO:VII;RNAi ID NO:6和CMP ID NO:VII;RNAi ID NO:7和CMP ID NO:VII;RNAi ID NO:8和CMP ID NO:VII;RNAi ID NO:9和CMP ID NO:VII;

RNAi ID NO:1和CMP ID NO:VIII;RNAi ID NO:2和CMP ID NO:VIII;RNAi ID NO:3和CMP ID NO:VIII;RNAi ID NO:4和CMP ID NO:VIII;RNAi ID NO:5和CMP ID NO:VIII;RNAi ID NO:6和CMP ID NO:VIII;RNAi ID NO:7和CMP ID NO:VIII;RNAi ID NO:8和CMP ID NO:VIII;RNAi ID NO:9和CMP ID NO:VIII;

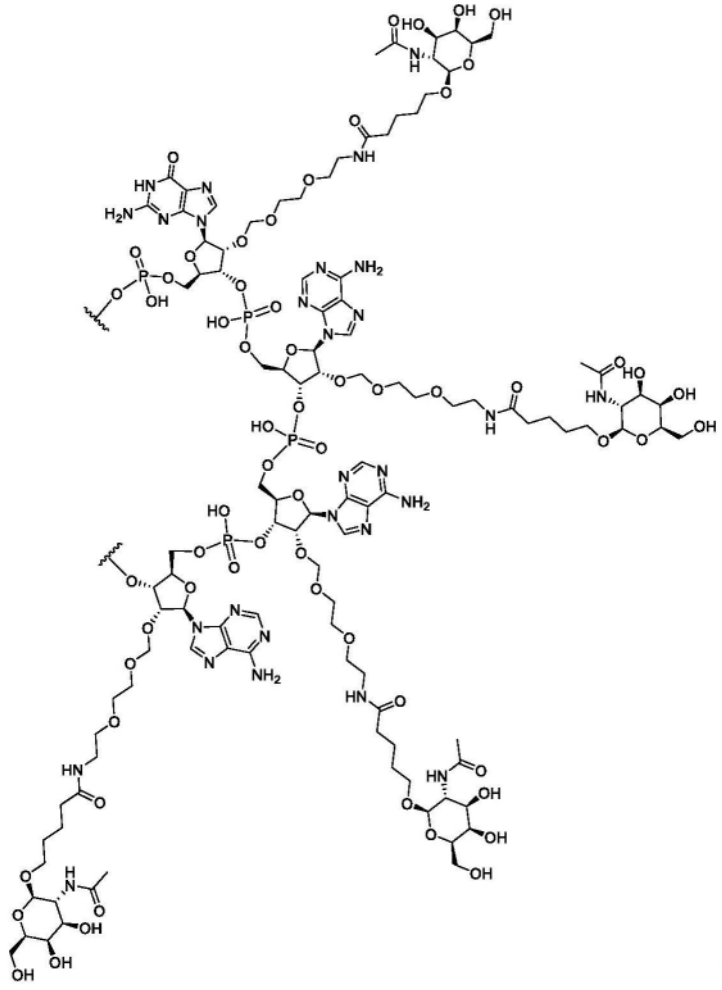
RNAi ID NO:1和CMP ID NO:XIII;RNAi ID NO:2和CMP ID NO:XIII;RNAi ID NO:3和CMP ID NO:XIII;RNAi ID NO:4和CMP ID NO:XIII;RNAi ID NO:5和CMP ID NO:XIII;RNAi ID NO:6和CMP ID NO:XIII;RNAi ID NO:7和CMP ID NO:XIII;RNAi ID NO:8和CMP ID NO:XIII;或RNAi ID NO:9和CMP ID NO:XIII;

或其药用盐、对映体或非对映体。

76.根据权利要求2至46和权利要求71至74中任一项所述的药物组合，其中所述RNAi寡核苷酸为RNAi ID NO:7：

寡核苷酸，所述寡核苷酸包含与反义链形成双链体区的正义链，其中：

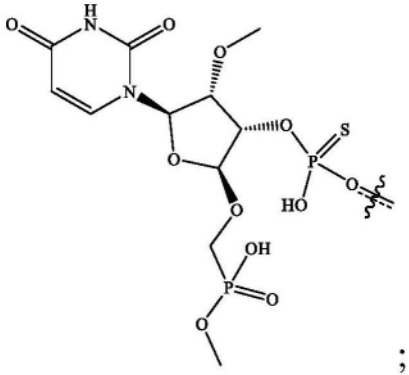
所述正义链包含如GACAAAAAUCCUCACAAUAAGCAGCCGAAAGGC UGC(SEQ ID NO:41)所示的序列，并且包含：在第3位、第8位至第10位、第12位、第13位和第17位处的2'-氟修饰的核苷酸；在第1位、第2位、第4位至第7位、第11位、第14位至第16位、第18位至第26位和第31位至第36位处的2'-O-甲基修饰的核苷酸；以及在第1位和第2位处的核苷酸之间的一个硫代磷酸酯核苷酸间键，其中所述正义链上的所述-GAAA-序列的所述核苷酸中的每个核苷酸缀合至单价GalNac部分，其中所述-GAAA-序列包含以下结构：



并且

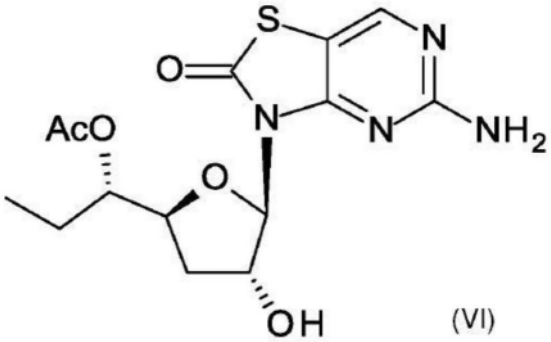
；

所述反义链包含如UUAUUGUGAGGAUUUUUGUCGG(SEQ ID NO:38)所示的序列，并且包含：在第2位、第3位、第5位、第7位、第8位、第10位、第12位、第14位、第16位和第19位处的2'-氟修饰的核苷酸；在第1位、第4位、第6位、第9位、第11位、第13位、第15位、第17位、第18位和第20位至第22位处的2'-O-甲基修饰的核苷酸；以及核苷酸1与核苷酸2之间、核苷酸2与核苷酸3之间、核苷酸3与核苷酸4之间、核苷酸20与核苷酸21之间以及核苷酸21与核苷酸22之间的五个硫代磷酸酯核苷酸间键，其中所述反义链的5'-核苷酸的糖的4'-碳具有以下结构：



;

并且所述TLR7激动剂为CMP ID NO:VI：

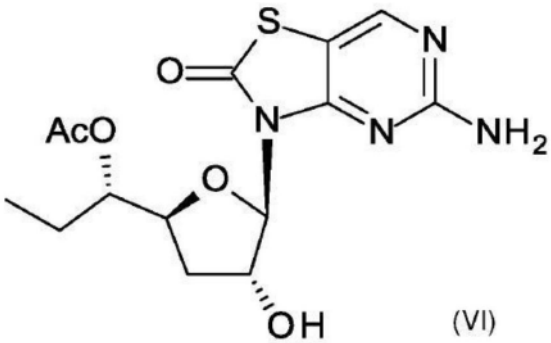


(VI)

或其药用盐、对映体或非对映体。

77.根据权利要求47至74中任一项所述的药物组合，其中包含GalNAc缀合的反义寡核苷酸和TLR7激动剂的所述组合选自由以下组合组成的组：CMP ID NO:15_1和VI；CMP ID NO:15_2和VI；CMP ID NO:16_1和VI；CMP ID NO:20_1和VI；CMP ID NO:23_1和VI；CMP ID NO:26_1和VI；CMP ID NO:29_1和VI；CMP ID NO:15_1和VII；CMP ID NO:15_2和VII；CMP ID NO:16_1和VII；CMP ID NO:20_1和VII；CMP ID NO:23_1和VII；CMP ID NO:26_1和VII；CMP ID NO:29_1和VII；CMP ID NO:15_1和VIII；CMP ID NO:15_2和VIII；CMP ID NO:16_1和VIII；CMP ID NO:20_1和VIII；CMP ID NO:23_1和VII；CMP ID NO:26_1和VIII；CMP ID NO:29_1和VIII；CMP ID NO:15_1和XIII；CMP ID NO:15_2和XIII；CMP ID NO:16_1和XIII；CMP ID NO:20_1和XIII；CMP ID NO:23_1和XIII；CMP ID NO:26_1和XIII；以及CMP ID NO:29_1和XIII，或其药用盐、对映体或非对映体。

78.根据权利要求47至74中任一项所述的药物组合，其中所述GalNAc缀合的反义寡核苷酸为如图5所示的CMP ID NO:15_1，并且所述TLR7激动剂为CMP ID NO:VI：



(VI)

或其药用盐、对映体或非对映体。

79.根据权利要求1至78中任一项所述的药物组合，其中所述治疗性寡核苷酸与药用盐

一起配制。

80.根据权利要求79所述的药物组合，其中所述药用盐为金属阳离子，优选地其中所述药用盐为Na^+或K^+。

81.根据权利要求1至80中任一项所述的药物组合，其中根据权利要求1至80中任一项所述的治疗性寡核苷酸和所述TLR7激动剂与药用载体一起配制。

82.根据权利要求81所述的药物组合，其中所述药用载体为水。

83.根据权利要求1至82中任一项所述的药物组合，其中所述治疗性寡核苷酸被配制在磷酸盐缓冲盐水中。

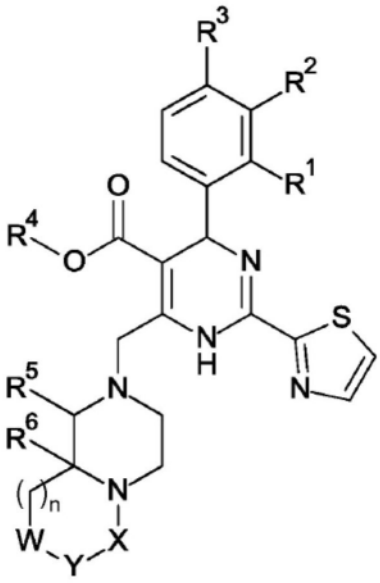
84.根据权利要求1至83中任一项所述的药物组合，其中所述治疗性寡核苷酸被配制用于皮下注射，并且所述TLR7激动剂被配制用于口服施用。

85.根据权利要求1至83中任一项所述的药物组合，其中所述治疗性寡核苷酸被配制用于静脉注射，并且所述TLR7激动剂被配制用于口服施用。

86.根据权利要求2至46、75、76和权利要求79至83中任一项所述的药物组合，其中所述治疗性寡核苷酸被配制用于皮下注射的siRNA，并且所述TLR7激动剂被配制用于口服施用。

87.根据权利要求1至86中任一项所述的药物组合，其中所述药物组合包含RNAi寡核苷酸和TLR7激动剂，其中所述药物组合进一步包含CpAM(核心蛋白变构调节剂)。

88.根据权利要求87所述的药物组合，其中所述CpAM具有根据如下所示的化合物(CpAM1)的式：



化合物 (CpAM1)

其中

R^1为氢、卤素或C_{1-6}烷基；

R^2为氢或卤素；

R^3为氢或卤素；

R^4为C_{1-6}烷基；

R^5为氢、羟基C_{1-6}烷基、氨基羰基、C_{1-6}烷氧基羰基或羧基；

R^6为氢、C_{1-6}烷氧基羰基或羧基-C_mH_{2m}-，

X为羰基或磺酰基；

Y为-CH_2-、-O-或-N(R^7)-，

其中R^7为氢、C_{1-6}烷基、卤代C_{1-6}烷基、C_{3-7}环烷基-C_mH_{2m}-、C_{1-6}烷氧基羰基-C_mH_{2m}-、-C_tH_{2t}-COOH、-卤代C_{1-6}烷基-COOH、-(C_{1-6}烷氧基)C_{1-6}烷基-COOH、-C_{1-6}烷基-O-C_{1-6}烷基-COOH、-C_{3-7}环烷基-C_mH_{2m}-COOH、-C_mH_{2m}-C_{3-7}环烷基-COOH、羟基-C_tH_{2t}-、羧基螺[3.3]庚基或羧基苯基-C_mH_{2m}-、羧基吡啶基-C_mH_{2m}-；

W为-CH_2-、-C(C_{1-6}烷基)$_2$-、-O-或羰基；

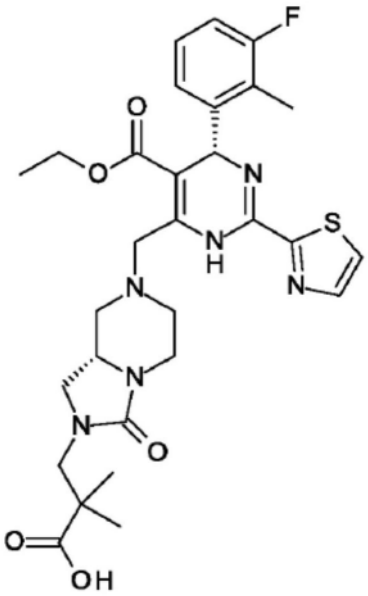
n为0或1；

m为0至7；

t为1至7；

或其药用盐、或对映体、或非对映体。

89.根据权利要求87或88所述的药物组合，其中所述CpAM为化合物(CpAM2)



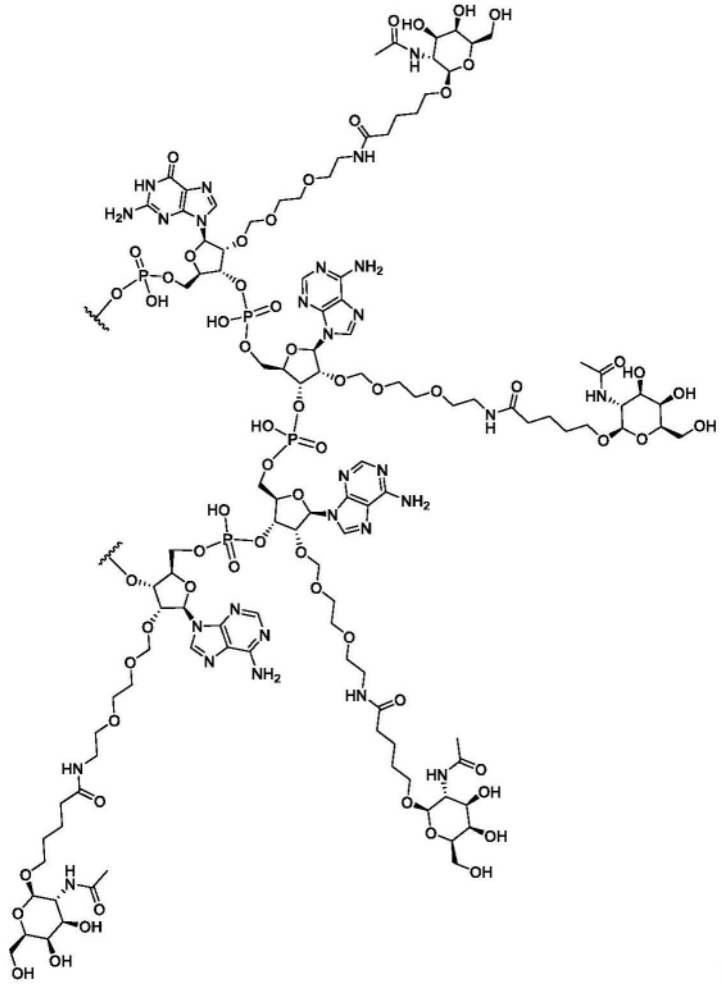
化合物 (CpAM2)

或其药用盐、对映体或非对映体。

90.一种药物组合，其包含RNAi寡核苷酸、TLR7激动剂和CpAM，其中所述RNAi寡核苷酸为RNAi ID NO:7：

寡核苷酸，所述寡核苷酸包含与反义链形成双链体区的正义链，其中：

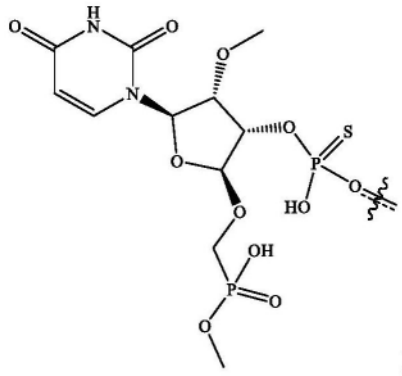
所述正义链包含如GACAAAAAUCCUCACAAUAAGCAGCCGAAAGGCUGC(SEQ ID NO:41)所示的序列，并且包含：在第3位、第8位至第10位、第12位、第13位和第17位处的2'-氟修饰的核苷酸；在第1位、第2位、第4位至第7位、第11位、第14位至第16位、第18位至第26位和第31位至第36位处的2'-O-甲基修饰的核苷酸；以及在第1位和第2位处的核苷酸之间的一个硫代磷酸酯核苷酸间键，其中所述正义链上的所述-GAAA-序列的所述核苷酸中的每个核苷酸缀合至单价GalNac部分，其中所述-GAAA-序列包含以下结构：



并且

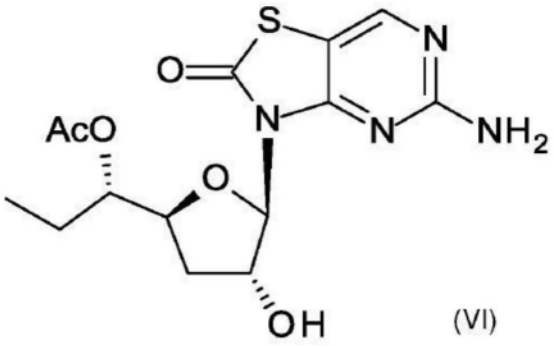
;

所述反义链包含如UUAUUGUGAGGAUUUUUGUCGG(SEQ ID NO:38)所示的序列,并且包含:在第2位、第3位、第5位、第7位、第8位、第10位、第12位、第14位、第16位和第19位处的2'-氟修饰的核苷酸;在第1位、第4位、第6位、第9位、第11位、第13位、第15位、第17位、第18位和第20位至第22位处的2'-O-甲基修饰的核苷酸;以及核苷酸1与核苷酸2之间、核苷酸2与核苷酸3之间、核苷酸3与核苷酸4之间、核苷酸20与核苷酸21之间以及核苷酸21与核苷酸22之间的五个硫代磷酸酯核苷酸间键,其中所述反义链的5'-核苷酸的糖的4'-碳具有以下结构:



;

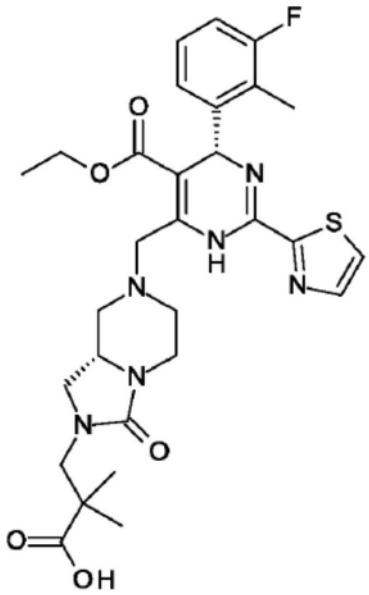
其中所述TLR7激动剂为CMP ID NO:VI:



(VI)

或其药用盐、对映体或非对映体；

并且其中所述CpAM为化合物(CpAM2)：



化合物 (CpAM2)

或其药用盐、对映体或非对映体。

91.一种药物组合物，其包含根据权利要求1至90中任一项所述的药物组合。

92.一种组分试剂盒，其包含根据权利要求1至90中任一项所述的治疗性寡核苷酸以及包装插页，所述包装插页带有关于与TLR7激动剂一起施用以治疗乙型肝炎病毒感染的说明。

93.根据权利要求92所述的组分试剂盒，其中在所述包装插页中提到的所述TLR7激动剂为根据权利要求1至90中任一项所述的TLR7激动剂。

94.根据权利要求92或93所述的组分试剂盒，其中所述试剂盒包含根据权利要求1至90中任一项所述的治疗性寡核苷酸和根据权利要求1至90中任一项所述的TLR7激动剂。

95.根据权利要求91至94中任一项所述的组分试剂盒，其中将所述治疗性寡核苷酸被配制用于皮下注射，并且所述TLR7激动剂被配制用于口服施用。

96.根据权利要求92至95中任一项所述的组分试剂盒，其中所述包装插页描述了对慢性乙型肝炎病毒感染的治疗。

97.根据权利要求1至96中任一项所述的药物组合、组合物或试剂盒，其中所述治疗性寡核苷酸呈转基因的形式，所述转基因被工程化以在细胞中表达所述寡核苷酸。

98.根据权利要求1至97中任一项所述的药物组合、组合物或试剂盒用于治疗乙型肝炎病毒感染的用途。

99.根据权利要求98所述的用途，其中待治疗的所述乙型肝炎病毒感染为慢性乙型肝炎病毒感染。

100.根据权利要求98或99所述的用途，其中所述治疗性寡核苷酸和所述TLR7激动剂以药学有效量施用。

101.根据权利要求98至100中任一项所述的用途，其中所述治疗性寡核苷酸每周施用，并且所述TLR7激动剂隔日施用。

102.根据权利要求98至101中任一项所述的用途，其中所述治疗性寡核苷酸以预施用1mg/kg至4mg/kg给药，并且所述TLR7激动剂以预施用150mg至170mg给药。

103.根据权利要求98至102中任一项所述的用途，其中所述治疗性寡核苷酸施用48周，并且施用84剂TLR7激动剂。

104.根据权利要求98至103中任一项所述的用途，其中所述治疗性寡核苷酸和所述TLR7激动剂的施用在同一周中开始。

105.根据权利要求98至104中任一项所述的用途，其中所述治疗性寡核苷酸呈用于皮下施用的剂型，并且所述TLR7激动剂呈用于口服施用的剂型。

106.根据权利要求98至105中任一项所述的用途，其中所述治疗性寡核苷酸的剂量为100mg/ml至150mg/ml，并且所述TLR7激动剂的剂量为150mg至170mg。

107.根据权利要求98至106中任一项所述的用途，其中在没有用靶向编码HBV mRNA转录物的非表面抗原的RNAi寡核苷酸进行治疗的情况下施用所述治疗性寡核苷酸。

108.根据权利要求98至107中任一项所述的用途，其中受试者未被施用选择性地靶向HBxAg mRNA转录物的RNAi寡核苷酸。

109.根据权利要求98至108中任一项所述的用途，其进一步包括向所述受试者施用有效量的恩替卡韦。

110.根据权利要求98至109中任一项所述的用途，其中所述治疗性寡核苷酸以转基因的形式递送，所述转基因被工程化以在细胞中表达所述寡核苷酸。

111.根据权利要求1至97中任一项所述的药物组合、组合物或试剂盒，其用于医药中。

112.根据权利要求1至97中任一项所述的药物组合、组合物或试剂盒，其用于治疗乙型肝炎病毒感染。

113.根据权利要求111或112所述的供使用的药物组合、组合物或试剂盒，其中待治疗的所述乙型肝炎病毒感染为慢性乙型肝炎病毒感染。

114.根据权利要求111至113中任一项所述的供使用的药物组合、组合物或试剂盒，其中所述治疗性寡核苷酸和所述TLR7激动剂以药学有效量施用。

115.根据权利要求111至114中任一项所述的供使用的药物组合、组合物或试剂盒，其中所述治疗性寡核苷酸每周施用，并且所述TLR7激动剂隔日施用。

116.根据权利要求111至115中任一项所述的供使用的药物组合、组合物或试剂盒，其中所述治疗性寡核苷酸以预施用1mg/kg至4mg/kg给药，并且所述TLR7激动剂以预施用150mg至170mg给药。

117.根据权利要求111至116中任一项所述的供使用的药物组合、组合物或试剂盒，其

中所述治疗性寡核苷酸施用48周，并且施用84剂TLR7激动剂。

118.根据权利要求111至117中任一项所述的供使用的药物组合、组合物或试剂盒，其中所述治疗性寡核苷酸和所述TLR7激动剂的施用在同一周中开始。

119.根据权利要求111至118中任一项所述的供使用的药物组合、组合物或试剂盒，其中所述治疗性寡核苷酸呈用于皮下施用的剂型，并且所述TLR7激动剂呈用于口服施用的剂型。

120.根据权利要求107至115中任一项所述的供使用的药物组合、组合物或试剂盒，其中所述治疗性寡核苷酸的剂量为100mg/ml至150mg/ml，并且所述TLR7激动剂的剂量为150mg至170mg。

121.根据权利要求111至120中任一项所述的供使用的药物组合、组合物或试剂盒，其中在没有用靶向编码HBV mRNA转录物的非表面抗原的RNAi寡核苷酸进行治疗的情况下施用所述治疗性寡核苷酸。

122.根据权利要求111至121中任一项所述的供使用的药物组合、组合物或试剂盒，其中所述受试者未被施用选择性地靶向HBxAg mRNA转录物的RNAi寡核苷酸。

123.根据权利要求111至122中任一项所述的供使用的药物组合、组合物或试剂盒，其进一步包括向所述受试者施用有效量的恩替卡韦。

124.根据权利要求111至123中任一项所述的供使用的药物组合、组合物或试剂盒，其中所述治疗性寡核苷酸以转基因的形式递送，所述转基因被工程化以在细胞中表达所述寡核苷酸。

125.治疗性寡核苷酸在制备用于治疗乙型肝炎病毒感染的第一药物中的用途，其中所述第一药物为根据权利要求1至97中任一项所述的治疗性寡核苷酸，并且其中所述第一药物待与第二药物组合施用，其中所述第二药物为根据权利要求1至97中任一项所述的TLR7激动剂。

126.根据权利要求1至97中任一项所述的药物组合、组合物或试剂盒在制备药物中的用途。

127.根据权利要求1至97中任一项所述的药物组合、组合物或试剂盒在制备用于治疗乙型肝炎病毒感染的药物中的用途。

128.根据权利要求125至127中任一项所述的用途，其中待治疗的所述乙型肝炎病毒感染为慢性乙型肝炎病毒感染。

129.根据权利要求125至128中任一项所述的用途，其中所述治疗性寡核苷酸和所述TLR7激动剂以药学有效量施用。

130.根据权利要求125至129中任一项所述的用途，其中所述治疗性寡核苷酸每周施用，并且所述TLR7激动剂隔日施用。

131.根据权利要求125至130中任一项所述的用途，其中所述治疗性寡核苷酸以预施用1mg/kg至4mg/kg给药，并且所述TLR7激动剂以预施用150mg至170mg给药。

132.根据权利要求125至131中任一项所述的用途，其中所述治疗性寡核苷酸施用48周，并且施用84剂TLR7激动剂。

133.根据权利要求125至132中任一项所述的用途，其中所述治疗性寡核苷酸和所述TLR7激动剂的施用在同一周中开始。

134.根据权利要求125至133中任一项所述的用途,其中所述治疗性寡核苷酸呈用于皮下施用的剂型,并且所述TLR7激动剂呈用于口服施用的剂型。

135.根据权利要求125至134中任一项所述的用途,其中所述治疗性寡核苷酸的剂量为100mg/ml至150mg/ml,并且所述TLR7激动剂的剂量为150mg至170mg。

136.根据权利要求125至135中任一项所述的用途,其中在没有用靶向编码HBV mRNA转录物的非表面抗原的RNAi寡核苷酸进行治疗的情况下施用所述治疗性寡核苷酸。

137.根据权利要求125至136中任一项所述的用途,其中受试者未被施用选择性地靶向HBxAg mRNA转录物的RNAi寡核苷酸。

138.根据权利要求125至137中任一项所述的用途,其进一步包括向所述受试者施用有效量的恩替卡韦。

139.根据权利要求125至138中任一项所述的用途,其中所述治疗性寡核苷酸以转基因的形式递送,所述转基因被工程化以在细胞中表达所述寡核苷酸。

140.一种用于治疗乙型肝炎病毒感染的方法,其包括:将治疗有效量的根据权利要求1至97中任一项所述的治疗性寡核苷酸与治疗有效量的根据权利要求1至91或权利要求94至97中任一项所述的TLR7激动剂组合施用于感染乙型肝炎病毒感染的受试者。

141.一种用于治疗乙型肝炎病毒感染的方法,其包括:向感染乙型肝炎病毒感染的受试者施用治疗有效量的根据权利要求1至97中任一项所述的药物组合、组合物或试剂盒。

142.根据权利要求140或141所述的方法,其中待治疗的所述乙型肝炎病毒感染为慢性乙型肝炎病毒感染。

143.根据权利要求140至142中任一项所述的方法,其中所述治疗性寡核苷酸和所述TLR7激动剂以药学有效量施用。

144.根据权利要求140至143中任一项所述的方法,其中所述治疗性寡核苷酸每周施用,并且所述TLR7激动剂隔日施用。

145.根据权利要求140至144中任一项所述的方法,其中所述治疗性寡核苷酸以预施用1mg/kg至4mg/kg给药,并且所述TLR7激动剂以预施用150mg至170mg给药。

146.根据权利要求140至145中任一项所述的方法,其中所述治疗性寡核苷酸施用48周,并且施用84剂TLR7激动剂。

147.根据权利要求140至146中任一项所述的方法,其中所述治疗性寡核苷酸和所述TLR7激动剂的施用在同一周中开始。

148.根据权利要求140至147中任一项所述的方法,其中所述治疗性寡核苷酸呈用于皮下施用的剂型,并且所述TLR7激动剂呈用于口服施用的剂型。

149.根据权利要求140至148中任一项所述的方法,其中所述治疗性寡核苷酸的剂量为100mg/ml至150mg/ml,并且所述TLR7激动剂的剂量为150mg至170mg。

150.根据权利要求140至149中任一项所述的方法,其中在没有用靶向编码HBV mRNA转录物的非表面抗原的RNAi寡核苷酸进行治疗的情况下施用所述治疗性寡核苷酸。

151.根据权利要求140至150中任一项所述的方法,其中所述受试者未被施用选择性地靶向HBxAg mRNA转录物的RNAi寡核苷酸。

152.根据权利要求140至151中任一项所述的方法,其进一步包括向所述受试者施用有效量的恩替卡韦。

153.根据权利要求140至152中任一项所述的方法，其中所述治疗性寡核苷酸以转基因的形式递送，所述转基因被工程化以在细胞中表达所述寡核苷酸。

154.一种减少乙型肝炎病毒表面抗原在细胞中的表达的方法，所述方法包括：向所述细胞递送根据权利要求1至91中任一项所述的药物组合或组合物。

155.根据权利要求154所述的方法，其中所述细胞为肝细胞。

156.根据权利要求154或155所述的方法，其中所述细胞在体内。

157.根据权利要求154或155所述的方法，其中所述细胞在体外。

158.根据权利要求154至157中任一项所述的方法，其中所述治疗性寡核苷酸以转基因的形式递送，所述转基因被工程化以在所述细胞中表达所述寡核苷酸。

159.一种基本上如本文并参考附图所述的药物组合、组合物、试剂盒、用途或方法。

用于治疗HBV的靶向HBV的治疗性寡核苷酸和TLR7激动剂的药物组合

技术领域

[0001] 本发明涉及用于治疗乙型肝炎病毒感染的组合物和方法。特别地，本发明涉及用于治疗慢性乙型肝炎患者的组合疗法，所述组合疗法包括施用靶向HBV的治疗性寡核苷酸和TLR7激动剂。

背景技术

[0002] HBV感染仍然是全世界的主要健康问题，估计有3.5亿慢性携带者受到影响。预计大约25％的携带者可能死于慢性肝炎、肝硬化或肝癌。乙型肝炎病毒是仅次于烟草的第二大致癌物，引发所有原发性肝癌中60％至80％的原发性肝癌。

[0003] HBV的外膜蛋白统称为乙型肝炎表面抗原(HBsAg)。HBsAg由三种相关的多肽组成，称为S、M和L，它们由重叠的开放阅读框(ORF)编码。最小的包膜蛋白是具有226个氨基酸的S，称为S-ORF。M和L从上游翻译起始位点产生，并且分别向S中添加55个和108个氨基酸。HBV S、M和L糖蛋白存在于完整的传染性HBV病毒粒子(称为Dane颗粒)的病毒包膜中，并且所有这三种多肽都大量产生和分泌，形成存在于慢性HBV患者血液中的非传染性亚病毒球形颗粒和丝状颗粒(两者均称为诱饵颗粒)。诱饵颗粒表面丰富的HBsAg被认为会抑制慢性HBV感染(CHB)患者的体液免疫和自发清除。

[0004] 针对慢性HBV感染的当前标准护理是通过口服核苷(酸)类似物(诸如恩替卡韦或替诺福韦)进行治疗，它们通过抑制HBV DNA合成来抑制HBV复制，但不直接作用于病毒抗原，例如HBsAg。核苷(酸)类似物即使经过长期疗法也仅显示出低水平的HBsAg清除率。在此方面，慢性乙型肝炎患者表现出非常弱的HBV T细胞应答并缺乏抗HBs抗体，这被认为是这些患者无法清除病毒的原因之一。

[0005] 临床上的一个重要目标是实现慢性HBV感染的功能性治愈，定义为HBsAg血清转化和血清HBV-DNA消除。预期这将产生持久的应答，从而防止肝硬化和肝癌的发展，并延长生存期。当前，由于病毒基因组作为共价闭合环状DNA(cccDNA)在受感染肝细胞的细胞核中长期或永久存在，因此无法完全根除慢性HBV感染。慢性HBV感染的完全治愈将需要从受感染的肝细胞中消除此cccDNA。

[0006] Soriano等人2017年的评论文章《研究药物的专家意见(Expert Opinion on Investigational Drugs)》第26卷第843页描述了旨在实现HBV的功能性治愈或完全治愈的药物开发的现状。这篇文章重点介绍了当前正在HBV疗法中测试的多于30种药物中的一些药物，还提到任何导致治愈的有效治疗都将可能需要结合病毒靶向疗法和免疫疗法。

[0007] Toll样受体TLR7是对病毒感染的先天免疫应答的组成部分，并且主要在浆细胞样细胞和B细胞上表达。这种免疫细胞的改变的应答性可能会促进慢性病毒感染期间先天免疫应答降低。因此，TLR7的激动剂诱导的激活代表了用于使用免疫疗法治疗慢性病毒感染的可能方法。几种TLR激动剂正在临床试验中进行测试，包括GS-9620。另选的TLR7激动剂描述于WO 2006/066080、WO 2016/055553和WO 2016/91698中。

[0008] 反义寡核苷酸本质上是能够通过与靶核酸杂交来调节靶基因表达的单链寡核苷酸。靶标调节可经由RNase H介导的降解或通过阻断转录进行下调。反义寡核苷酸也可以上调靶标，例如经由剪接切换或微小RNA抑制。对于肝脏中的靶标，GalNAc缀合已被证明对于递送反义寡核苷酸非常有效。WO 2014/179627和WO2015/173208描述了通过结合GalNAc缀合使用单链反义寡核苷酸降解肝细胞中的HBV mRNA而进行的HBV治疗。WO2015/173208中简要提到了包括TLR7激动剂GS-9620在内的各种组合疗法。

[0009] WO2016/077321描述了通过结合正义链上的GalNAc缀合使用双链siRNA降解肝细胞中的HBV mRNA而进行的HBV治疗。简要提到了包括TLR7激动剂在内的各种组合疗法。

[0010] 据我们所知，尚未在体外或在体内测试过治疗性寡核苷酸和TLR7激动剂的特定组合。

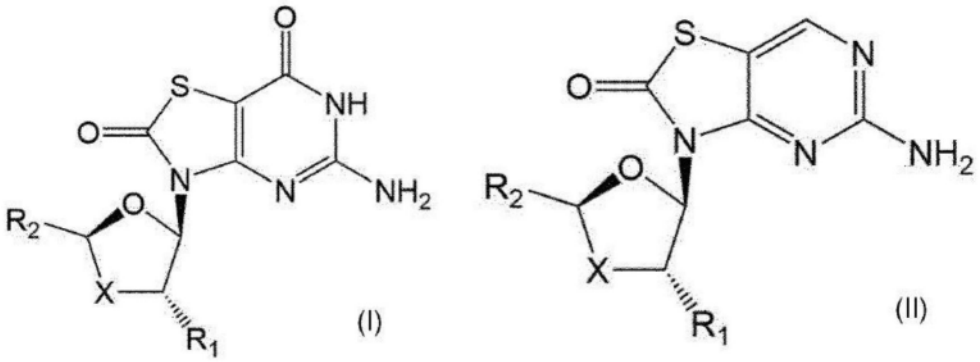
[0011] 发明目的

[0012] 本发明鉴定了靶向HBV的治疗性寡核苷酸和TLR7激动剂的新型组合，其在延长血清HBV-DNA减少和延缓HBsAg反弹方面提供了优于单一化合物治疗的优势。此外，通过组合治疗可实现治疗窗的增加，因为与单一治疗中使用的药物浓度相比，使用组合治疗时可以低3倍至5倍的剂量实现显著改善的效果，并且与高剂量的相同组合相比，通过低3倍至5倍剂量的组合治疗可实现基本相同的效果。

发明内容

[0013] 本发明的一个方面是一种药物组合，该药物组合包含以下项或由以下项组成：第一医疗化合物，该第一医疗化合物为治疗性寡核苷酸；和第二医疗化合物，该第二医疗化合物为如下定义的式(I)或式(II)的TLR7激动剂。本发明的一个优选实施方案是一种药物组合，该药物组合包含以下项或由以下项组成：第一医疗化合物，该第一医疗化合物为RNAi寡核苷酸，优选为用于降低HBsAg mRNA的表达的寡核苷酸，该寡核苷酸包含长度为19个至30个核苷酸的反义链，其中该反义链包含与HBsAg mRNA的如ACAANAAUCCUCACAAUA(SEQ ID NO:33)所示的序列互补的区；和第二医疗化合物，该第二医疗化合物为如下定义的式(I)或式(II)的TLR7激动剂。本发明的另一个实施方案是一种药物组合，该药物组合包含以下项或由以下项组成：第一医疗化合物，该第一医疗化合物为反义寡核苷酸，优选为长度为13个至22个核苷酸的GalNAc缀合的反义寡核苷酸，该GalNAc缀合的反义寡核苷酸具有至少12个核苷酸的与SEQ ID NO:1的从第1530位至第1602位的连续序列100％互补的连续核苷酸序列；和第二医疗化合物，该第二医疗化合物为如下定义的式(I)或式(II)的TLR7激动剂。

[0014] 式(I)和式(II)：

[0015] 

[0016] 其中X为CH_2或S；

[0017] 对于式(I)，R_1为-OH或-H，并且R_2为1-羟基丙基或羟基甲基，

[0018] 对于式(II)，R_1为-OH或-H或乙酰氧基，并且R_2为1-乙酰氧基丙基或1-羟基丙基或1-羟基甲基或乙酰氧基(环丙基)甲基或乙酰氧基(丙炔-1-基)甲基，

[0019] 或其药用盐、对映体或非对映体。

[0020] 本发明进一步的方面涉及该药物组合在治疗HBV感染个体，特别是患有慢性HBV的个体中的用途。

[0021] 本发明进一步的方面是治疗性寡核苷酸在制备用于治疗乙型肝炎病毒感染的第一药物中的用途，其中该第一药物为如本申请中所述的治疗性寡核苷酸，并且其中该第一药物有待与第二药物组合施用，其中该第二药物为如本申请中所述的TLR7激动剂。

[0022] 在一个实施方案中，该治疗性寡核苷酸化合物(第一药物或第一医疗化合物)被配制用于皮下注射，并且该TLR7激动剂化合物(第二药物或第二医疗化合物)被配制用于口服施用。因为医疗化合物将通过两种不同的施用途径施用，所以医疗化合物可遵循不同的施用方案。为了获得最佳组合效果，第一医疗化合物和第二医疗化合物被施用间隔小于一个月，例如间隔小于一周，例如间隔两天，例如在同一天。

[0023] 本发明进一步的方面是一种组分试剂盒，该组分试剂盒包含该第一医疗化合物(第一药物)和包装插页，该包装插页带有对在HBV的治疗中该第二医疗化合物(第二药物)的施用的说明。在一个实施方案中，该组分试剂盒包含该第一医疗化合物和该第二医疗化合物两者。

[0024] 本发明进一步的方面是一种用于治疗乙型肝炎病毒感染的方法，该方法包括：对感染乙型肝炎病毒的受试者(例如慢性感染个体)结合治疗有效量的如本申请中所述的TLR7激动剂(第二药物)施用治疗有效量的如本申请中所述的治疗性寡核苷酸(第一药物)。

[0025] 在高度优选的实施方案中，本申请中提到的该治疗性寡核苷酸为RNAi寡核苷酸，优选为小干扰RNA(siRNA)，优选为用于降低HBsAg mRNA的表达的RNAi寡核苷酸或siRNA。在不同的实施方案中，该治疗性寡核苷酸为反义寡核苷酸，优选为GalNAc缀合的反义寡核苷酸，优选为靶向HBV的反义寡核苷酸或GalNAc缀合的反义寡核苷酸。

附图说明

[0026] 图1：示出了示例性的反义寡核苷酸缀合物，显示了各种立体异构体，其中寡核苷酸以波浪线(A-D)或“寡核苷酸”(E-H和K)或T_2(I-J)表示，并且靶向缀合物部分的脱唾液酸糖蛋白受体为三价N-乙酰半乳糖胺部分。化合物A至D包含二赖氨酸支链分子，PEG3间隔物和三个末端GalNAc碳水化合物部分。在化合物A和B中，寡核苷酸直接附接至靶向缀合物部分的脱唾液酸糖蛋白受体，无需接头。在化合物C和D中，寡核苷酸通过C6接头附接于靶向缀合物部分的脱唾液酸糖蛋白受体。化合物E-J包含：可商购的三倍体支链分子；和具有不同长度和结构的间隔物；以及三个末端GalNAc碳水化合物部分。化合物K由单体GalNAc亚磷酰胺组成，该单体GalNAc亚磷酰胺作为合成的一部分添加到寡核苷酸中，同时仍在固体支持物上，X＝S或O并且n＝1-3(参见WO 2017/178656)。图1B和图1D在本文中也被称为GalNAc2或GN2，其分别不带有和带有C6接头。

[0027] 图2：CMP ID NO:29_1的结构式。其药用盐包含与化合物缔合的一价或二价阳离

子,诸如Na^+、K^+和Ca^{2+}或它们的混合物。

[0028] 图3:CMP ID NO:23_1的结构式。其药用盐包含与化合物缔合的一价或二价阳离子,诸如Na^+、K^+和Ca^{2+}或它们的混合物。

[0029] 图4:CMP ID NO:16_1的结构式。其药用盐包含与化合物缔合的一价或二价阳离子,诸如Na^+、K^+和Ca^{2+}或它们的混合物。

[0030] 图5:CMP ID NO:15_1的结构式。其药用盐包含与化合物缔合的一价或二价阳离子,诸如Na^+、K^+和Ca^{2+}或它们的混合物。

[0031] 图6:CMP ID NO:15_2的结构式。其药用盐包含与化合物缔合的一价或二价阳离子,诸如Na^+、K^+和Ca^{2+}或它们的混合物。

[0032] 图7:CMP ID NO:26_1的结构式。其药用盐包含与化合物缔合的一价或二价阳离子,诸如Na^+、K^+和Ca^{2+}或它们的混合物。

[0033] 图8:CMP ID NO:20_1的结构式。其药用盐包含与化合物缔合的一价或二价阳离子,诸如Na^+、K^+和Ca^{2+}或它们的混合物。

[0034] 图9:显示了各种单一治疗和组合治疗对来自AAV/HBV小鼠的血清中的HBV-DNA的影响。用以下项中的任一项处理后的图A:盐水(媒介物,虚线和圆圈);隔日一次(QOD)以100mg/kg施用的CMP ID NO:VI(TLR7激动剂)(虚线;矩形);以1.5mg/kg给药的CMP ID NO:15_1(抗HBV ASO)(虚线;三角形);或两者的组合(实线和正方形)。用以下项中的任一项处理后的图B:盐水(媒介物,虚线和圆圈);每周一次(QW)以100mg/kg施用的CMP ID NO:VI(TLR7激动剂)(虚线,矩形);以1.5mg/kg给药的CMP ID NO:15_1(抗HBV ASO)(虚线;三角形);或两者的组合(实线和正方形)。用以下项中的任一项处理后的图C:盐水(媒介物,虚线和圆圈);每隔一天(QOD)以100mg/kg施用的CMP ID NO:VI(TLR7激动剂)(虚线;矩形);以7.5mg/kg给药的CMP ID NO:15_1(抗HBV ASO)(虚线;三角形);或两者的组合(实线和正方形)。用以下项中的任一项处理后的图D:盐水(媒介物,虚线和圆圈);每周一次(QW)以100mg/kg施用的CMP ID NO:VI(TLR7激动剂)(虚线,矩形);以7.5mg/kg给药的CMP ID NO:15_1(抗HBV ASO)(虚线;三角形);或两者的组合(实线和正方形)。

[0035] 图10:显示了各种单一治疗和组合治疗对来自AAV/HBV小鼠的血清中的HBsAg的影响。用以下项中的任一项处理后的图A:盐水(媒介物,虚线和圆圈);隔日一次(QOD)以100mg/kg施用的CMP ID NO:VI(TLR7激动剂)(虚线;矩形);以1.5mg/kg给药的CMP ID NO:15_1(抗HBV ASO)(虚线;三角形);或两者的组合(实线和正方形)。用以下项中的任一项处理后的图B小鼠:盐水(媒介物,虚线和圆圈);每周一次(QW)以100mg/kg施用的CMP ID NO:VI(TLR7激动剂)(虚线,矩形);以1.5mg/kg给药的CMP ID NO:15_1(抗HBV ASO)(虚线;三角形);或两者的组合(实线和正方形)。用以下项中的任一项处理后的图C:盐水(媒介物,虚线和圆圈);每隔一天(QOD)以100mg/kg施用的CMP ID NO:VI(TLR7激动剂)(虚线;矩形);以7.5mg/kg给药的CMP ID NO:15_1(抗HBV ASO)(虚线;三角形);或两者的组合(实线和正方形)。用以下项中的任一项处理后的图D:盐水(媒介物,虚线和圆圈);每周一次(QW)以100mg/kg施用的CMP ID NO:VI(TLR7激动剂)(虚线,矩形);以7.5mg/kg给药的CMP ID NO:15_1(抗HBV ASO)(虚线;三角形);或两者的组合(实线和正方形)。

[0036] 图11:显示了在HBV基因组的组织结构的示意图上的RNAi靶位点的实例。

[0037] 图12:显示了用于减少HDI小鼠中HBsAg表达的寡核苷酸的单剂量评估。

[0038] 图13:显示了在利用HBsAg靶向寡核苷酸的指定给药方案期间随时间变化的血浆HBsAg水平的图形表示。如该实例中所示,寡核苷酸证明了临床前效力并保持远超过给药周期的降低的水平。

[0039] 图14:显示了描绘使用报告子测定在HeLa细胞中进行HBsAg作图的结果的图表。指定浓度下的靶向HBV基因组第254位的未修饰siRNA用作阳性对照。来自Thermo Fisher的可商购的Silencer siRNA用作这些实验的阴性对照。误差棒代表SEM。

[0040] 图15:显示了基因型保守性比较,表明在靶向HBsAg的寡核苷酸HBV-219中设计的错配增加了跨HBV基因型的覆盖率。

[0041] 图16:示出了设计用于使用HBV基因型A作为原型序列的psiCHECK2报告子测定的介体。

[0042] 图17:显示了寡核苷酸的几个实例,所述寡核苷酸被设计用于评估引入错配的影响。亲本和错配链的寡核苷酸序列对准显示且错配位置加框。进一步描述了在psiCHECK2报告子测定中使用的对应报告子序列。

[0043] 图18:显示了在错配研究中评估的寡核苷酸的单剂量滴定图,其证明了在体内可耐受引导链中的错配。

[0044] 图19:显示了体内剂量滴定图,证明了将错配引入靶向HBsAg的寡核苷酸不会不利地影响体内效力。

[0045] 图20:显示了具有化学修饰且呈双链形式的靶向HBsAg的寡核苷酸(HBV(s)-219)的实例。较深的阴影表示2'-O-甲基核糖核苷酸。较浅的阴影表示2'-氟-脱氧核糖核苷酸。

[0046] 图21A:描绘了检测肝细胞中HBV核心抗原(HBcAg)的亚细胞分布的免疫组织化学染色结果。

[0047] 图21B:描绘了RNA测序结果,其将检测到的RNA转录物序列与HBV pgRNA进行作图。

[0048] 图22A:描绘了在HBV的流体动力注射(HDI)模型中,相比于媒介物对照和靶向HBV X抗原(HBxAg)mRNA的RNAi寡核苷酸,用靶向HBsAg mRNA的HBV(s)-219寡核苷酸前体HBV(s)-219P2处理后的HBsAg mRNA表达的时程。

[0049] 图22B:描绘了在AAV-HBV模型中,相比于媒介物对照和靶向HBxAg mRNA的RNAi寡核苷酸,用靶向HBsAg mRNA的HBV(s)-219寡核苷酸前体HBV(s)-219P2处理后的HBsAg mRNA表达的时程。

[0050] 图23:显示了免疫组织化学染色结果,其显示相比于媒介物对照和靶向HBxAg mRNA的RNAi寡核苷酸(GalXC-HBVX),用靶向HBsAg mRNA的HBV(s)-219寡核苷酸处理后,从HBV的AAV-HBV模型和HDI模型获得的肝细胞中HBcAg的亚细胞分布。

[0051] 图24A至图24D:显示了在PXB-HBV模型中HBV(s)-219前体1(HBV(s)-219P1)的抗病毒活性。向9只小鼠的群组每周一次共3次地通过皮下施用给予在PBS中0mg/kg或3mg/kg剂量的HBV(s)-219P1。在所示的每个时间点处(图24A和图24B)通过非终末下颌面颊采血分析来自每个群组的六只小鼠的血清HBsAg和血清HBV DNA。在第28天(从第一剂量HBV(s)-219P1开始),对所有剩余的小鼠实施了安乐死,并收集了肝活检组织用于通过RT-qPCR分析肝HBV DNA(图24C)和肝cccDNA(图24D)。

[0052] 图25A至图25C:显示,HBV(s)-219前体2(HBV(s)-219P2)增强了恩替卡韦的抗病毒活性。在HBV小鼠流体动力注射(HDI)模型中,在第1天将单剂量的HBV(s)-219P2皮下施用给

小鼠，然后每天口服给药500ng/kg恩替卡韦(ETV)持续14天。通过qPCR测量了循环病毒载量(HBV DNA)(图25A)。通过ELISA测量了血浆HBsAg水平(图25B)。通过qPCR测量了肝HBV mRNA和pgRNA水平(图25C)。结果显示组合疗法具有明显的累加作用。单独的ETV疗法显示对循环HBsAg或肝病毒RNA没有效力。通过HBsAg或HBV RNA测量的HBV(s)-219P2的抗病毒活性不受ETV共同给药的影响。“BLOD”是指“低于检测限”。

[0053] 图26A至图26B：显示了靶向S抗原(HBV(s)-219P2)或X抗原(称为GalXC-HBVX)的GalNac缀合的寡核苷酸的HBsAg抑制活性的比较。结果显示，HBVS-219P2抑制HBsAg的持续时间比GalXC-HBVX或RNAi剂两者的等摩尔组合更长。图26A显示了RNAi靶位点在HBV基因组中的位置影响表达HBV的小鼠中的HBsAg恢复动力学。图26B显示了给药后2周(左图)和给药后9周(右图)的血浆HBsAg水平，表明单独地或与HBV(s)-219P2组合地靶向HBVX编码区导致较短的活性持续时间。显示了个体动物数据。几个数据点(最浅的灰色圆圈)低于检测限。

[0054] 图27A至图27C：显示了在用HBV(s)-219P2、GalXC-HBVX或1:1组合处理的表达HBV的小鼠中HBV核心抗原(HBcAg)的亚细胞定位。图27A显示了在施用后第1周、第2周、第6周、第9周和第13周获得并针对HBcAg染色的肝切片中的代表性肝细胞。图27B显示了每只动物中具有细胞核染色的HBcAg阳性细胞的百分比(n＝3/组，在给药后2周，每只动物计数了50个细胞)。设计并测试了靶向X和S开放阅读框内的另选序列。图27C显示了在施用靶向S抗原或X抗原的另选RNAi寡核苷酸后第2周、第3周和第9周获得的肝细胞中的HBcAg的亚细胞分布。

[0055] 图28：以群组信息显示了设计用于评估健康患者中HBV(s)-219的安全性和耐受性以及HBV(s)-219对HBV患者的治疗效力的研究的剂量。

[0056] 图29A至图29B：显示了HBV(s)-219和HBV(s)-219P2的化学结构。(图29A)HBV(s)-219的化学结构。(图29B)HBV(s)-219P2的化学结构。

[0057] 图30：显示了HBV-LNA(CMP ID NO:15_1，根据本发明的反义寡核苷酸)和DCR-S219(根据本发明的RNAi寡核苷酸，特别是siRNA)随时间变化对降低HBsAg滴度的影响。“DCR-AUD1”(靶向HBV以外的序列的对照siRNA)和“媒介物”(无菌水)为阴性对照。图30中HBV-LNA的剂量为6.6mg/kg，而DCR-S219的剂量为9mg/kg，但是HBV-LNA的摩尔剂量为DCR-S219的摩尔剂量的约三倍高。

[0058] 定义

[0059] 寡核苷酸

[0060] 如本文所用，术语“寡核苷酸”如本领域技术人员通常理解的那样被定义为包含两个或更多个共价连接的核苷的分子。此类共价结合的核苷也可被称为核酸分子或寡聚物。寡核苷酸通常是在实验室中通过先经固相化学合成后再加以纯化和分离而制备。当提及寡核苷酸的序列时，提及的是共价联接的核苷酸或核苷的核碱基部分或其修饰的序列或顺序。本发明的寡核苷酸是人造的，是化学合成的，通常是纯化或分离的。本发明的寡核苷酸可包含一个或多个经修饰的核苷或核苷酸，诸如2’糖修饰的核苷。

[0061] 另外，寡核苷酸为长度例如小于100个核苷酸的短核酸。寡核苷酸可以是单链或双链的。寡核苷酸可具有或可不具有双链体区。作为一组非限制性实例，寡核苷酸可以为但不限于小干扰RNA(siRNA)、微小RNA(miRNA)、短发夹RNA(shRNA)、dicer底物干扰RNA(dsiRNA)、反义寡核苷酸、短siRNA或单链siRNA。在一些实施方案中，双链寡核苷酸为RNAi

寡核苷酸。

[0062] 合成的

[0063] 如本文所用,术语“合成的”是指这样的核酸或其他分子,其是人工合成的(例如,使用机器(例如,固态核酸合成仪))或不是衍生自通常产生该分子的天然来源(例如,细胞或生物体)的。

[0064] 双链寡核苷酸

[0065] 如本文所用,术语“双链寡核苷酸”是指基本上为双链体形式的寡核苷酸。在一些实施方案中,在共价分离的核酸链的核苷酸反平行序列之间形成双链寡核苷酸的一个或多个双链体区的互补碱基配对。在一些实施方案中,在共价联接的核酸链的核苷酸反平行序列之间形成双链寡核苷酸的一个或多个双链体区的互补碱基配对。在一些实施方案中,双链寡核苷酸的一个或多个双链体区的互补碱基配对由折叠(例如,经由发夹)的单个核酸链形成,以提供碱基配对在一起的核苷酸互补反平行序列。在一些实施方案中,双链寡核苷酸包含彼此完全呈双链的两条共价分离的核酸链。然而,在一些实施方案中,双链寡核苷酸包含部分地呈双链的两条共价分离的核酸链,例如,在一个或两个末端具有突出端。在一些实施方案中,双链寡核苷酸包含部分地互补的核苷酸反平行序列,并且因此可具有一个或多个错配,其可包括内部错配或末端错配。

[0066] 链

[0067] 如本文所用,术语“链”是指通过核苷酸间键(internucleotide linkage)(例如,磷酸二酯键(phosphodiester linkage)、硫代磷酸酯键)联接在一起的核苷酸的单个连续序列。在一些实施方案中,链具有两个自由端,例如,5’端和3’端。

[0068] 双链体

[0069] 如本文所用,术语“双链体”就核酸(例如,寡核苷酸)而论,是指通过核苷酸的两个反平行序列的互补碱基配对形成的结构。

[0070] 突出端

[0071] 如本文所用,术语“突出端”是指由一条链或一个区延伸超出所述一条链或所述一个区与其形成双链体的互补链的末端而形成的一个或多个末端非碱基配对核苷酸。在一些实施方案中,突出端包含从双链寡核苷酸的5’末端或3’末端处的双链体区延伸的一个或多个未配对的核苷酸。在某些实施方案中,突出端为双链寡核苷酸的反义链或正义链上的3’突出端或5’突出端。

[0072] 环

[0073] 如本文所用,术语“环”是指核酸(例如,寡核苷酸)的未配对区,所述未配对区的侧翼为核酸的两个反平行区,所述两个反平行区彼此充分互补,使得在适当的杂交条件下(例如,在磷酸盐缓冲液中,在细胞中),位于未配对区侧翼的两个反平行区杂交形成双链体(称为“茎”)。

[0074] RNAi寡核苷酸

[0075] 如本文所用,术语“RNAi寡核苷酸”是指以下项中的任一项:(a)具有正义链(过客)和反义链(引导)的双链寡核苷酸,其中反义链或反义链的一部分由Argonaute 2(Ago2)核酸内切酶用于裂解靶mRNA,或(b)具有单反义链的单链寡核苷酸,其中该反义链(或该反义链的一部分)由Ago2核酸内切酶用于裂解靶mRNA。

[0076] RNAi剂

[0077] 如本文可互换使用的术语“iRNA”、“RNAi剂”、“iRNA剂”和“RNA干扰剂”是指一种药剂(例如,RNAi寡核苷酸),该药剂包含本文的RNA核苷,并经由RNA诱导沉默复合物(RISC)途径介导RNA转录物的靶向裂解。iRNA通过被称为RNA干扰(RNAi)的过程引导mRNA的序列特异性降解。iRNA调节(例如抑制)靶核酸在细胞(例如受试者(例如哺乳动物受试者)体内的细胞)中的表达。RNAi剂包括单链RNAi剂和双链siRNA,以及短发夹RNA(shRNA)。本发明的寡核苷酸或其连续核苷酸序列可呈RNAi剂的形式,或形成RNAi剂的一部分,诸如siRNA或shRNA。在本发明的一些实施方案中,本发明的寡核苷酸或其连续核苷酸序列为RNAi剂,例如siRNA。

[0078] siRNA

[0079] 术语siRNA是指小干扰核糖核酸RNAi剂并且是一类双链RNA分子,在本领域中也称为短干扰RNA或沉默RNA。siRNA通常包含正义链(也称为过客链)和反义链(也称为引导链),其中每条链的长度为17个至30个核苷酸,通常长度为19个至25个核苷,其中反义链与靶核酸(合适地是成熟的mRNA序列)互补(例如完全互补),并且正义链与反义链互补,使得正义链和反义链形成双链体或双链体区。siRNA链可形成平末端双链体,或者有利地,有义和反义链的3’末端可形成3’突出端,例如1、2或3个核苷。在一些实施方案中,正义链和反义链均具有2nt 3’突出端。因此,双链体区的长度可以为例如17个至25个核苷酸,例如长度为21个至23个核苷酸。

[0080] 一旦进入细胞内,反义链就被掺入RISC复合物中,所述RISC复合物介导靶核酸的靶降解或靶抑制。除了RNA核苷之外,siRNA通常还包含修饰的核苷,或者在一些实施方案中,siRNA链的所有核苷酸都可被修饰(正义2’糖修饰的核苷诸如LNA(参见例如WO2004083430、WO2007085485)、2’-氟、2’-O-甲基或2’-O-甲氧基乙基可被掺入siRNA中)。在一些实施方案中,siRNA的过客链可以是不连续的(例如,参见WO2007107162)。已经报道了在siRNA的反义链的种子区出现的热不稳定核苷酸的掺入可用于减少siRNA的脱靶活性(例如,参见WO18098328)。

[0081] 在一些实施方案中,dsRNA剂,诸如本发明的siRNA,包含至少一个修饰的核苷酸。在一些实施方案中,正义链的基本上所有核苷酸都包含修饰;反义链的基本上所有核苷酸都包含修饰;或者正义链的基本上所有核苷酸都包含修饰并且反义链的基本上所有核苷酸都包含修饰。在其他实施方案中,正义链的所有核苷酸均包含修饰;反义链的所有核苷酸都包含修饰,或者正义链的所有核苷酸都包含修饰并且反义链的所有核苷酸都包含修饰。

[0082] 在一些实施方案中,修饰的核苷酸可独立地选自由以下项组成的组:脱氧核苷酸、3’-末端脱氧胸腺嘧啶(dT)核苷酸、2’-O-甲基修饰的核苷酸、2’-氟修饰的核苷酸、2’-脱氧修饰的核苷酸、锁定的核苷酸、未锁定的核苷酸、构象受限的核苷酸、受限的乙基核苷酸、脱碱基核苷酸、2’-氨基修饰的核苷酸、2’-O-烯丙基修饰的核苷酸、2’-C-烷基修饰的核苷酸、2’-羟基修饰的核苷酸、2’-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2’-O-烷基修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸、

[0083] 氨基磷酸酯、包含核苷酸的非天然碱基、未联接的核苷酸、四氢吡喃修饰的核苷酸、1,5-脱水己糖醇修饰的核苷酸、环己烯基修饰的核苷酸、包含硫代磷酸酯基团的核苷酸、包含甲基膦酸酯基团的核苷酸、包含5’-磷酸的核苷酸、包含5’-磷酸模拟物的核苷酸、

乙二醇修饰的核苷酸和2-O-(N-甲基乙酰胺)修饰的核苷酸以及它们的组合。合适地,siRNA在反义链的5'端包含5'磷酸基团或5'-磷酸模拟物。在一些实施方案中,反义链的5'端是RNA核苷。

[0084] 在一个实施方案中,dsRNA剂进一步包含至少一个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键。硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键可在一条或两条链(例如,反义链;或正义链)的3'-末端处;或者硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷间键可在一条或两条链(例如,反义链;或正义链)的5'-末端处;或者硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷间键可在一条或两条链(例如,反义链;或正义链)的5'-末端和3'-末端两者处。在一些实施方案中,剩余的核苷间键是磷酸二酯键。

[0085] dsRNA剂可以进一步包含配体。在一些实施方案中,配体缀合至正义链的3'端。对于生物学分布,例如,可将siRNA缀合至靶向配体和/或配制成脂质纳米颗粒。

[0086] 本发明的其他方面涉及包含这些dsRNA的药物组合物,例如适合用于治疗用途的siRNA分子,以及通过施用dsRNA分子(例如本发明的siRNA)来抑制靶基因表达的方法,例如用于治疗如本文所公开的各种疾病。

[0087] 四环

[0088] 如本文所用,术语"四环"是指增加通过核苷酸的侧翼序列的杂交形成的相邻双链体的稳定性的环。稳定性的增加可检测为相邻茎双链体的解链温度(T_m)的升高,其高于从由随机选择的核苷酸序列组成的具有可比较长度的一组环预期的相邻茎双链体的平均T_m。例如,四环在10mM $NaHPO_4$中可赋予包含长度为至少2个碱基对的双链体的发夹至少50℃、至少55℃、至少56℃、至少58℃、至少60℃、至少65℃或至少75℃的解链温度。在一些实施方案中,四环可通过堆积相互作用来稳定相邻茎双链体中的碱基对。另外,四环中核苷酸之间的相互作用包括但不限于非Watson-Crick碱基配对、堆积相互作用、氢键和接触相互作用(Cheong等人,Nature 1990年8月16日;346(6285):680-2;Heus和Pardi,Science 1991年7月12日;253(5016):191-4)。在一些实施方案中,四环包含4个至5个核苷酸。在某些实施方案中,四环包含以下项或由以下项组成:可被修饰或不可被修饰(例如,可与靶向部分缀合或不可与靶向部分缀合)的三个、四个、五个或六个核苷酸。在一个实施方案中,四环由四个核苷酸组成。可在四环中使用任何核苷酸,并且可如Cornish-Bowden(1985)Nucl.Acids Res.13:3021-3030中所述使用用于此类核苷酸的标准IUPAC-IUB符号。例如,字母"N"可用于表示任何碱基都可在该位置,字母"R"可用于表明A(腺嘌呤)或G(鸟嘌呤)可在该位置,而"B"可用于表明C(胞嘧啶)、G(鸟嘌呤)或T(胸腺嘧啶)可在该位置。四环的实例包括四环的UNCG家族(例如,UUCG)、四环的GNRA家族(例如,GAAA)和CUUG四环(Woese等人,Proc Natl Acad Sci USA.1990年11月;87(21):8467-71;Antao等人,Nucleic Acids Res.1991年11月11日;19(21):5901-5)。DNA四环的实例包括四环的d(GNNA)家族(例如,d(GTTA))、四环的d(GNRA)家族、四环的d(GNAB)家族、四环的d(CNNG)家族和四环的d(TNCG)家族(例如,d(TTCG))。参见例如:Nakano等人Biochemistry,41(48),14281-14292,2002.SHINJI等人Nippon Kagakkai Koen Yokoshu第78卷;第2号;第731页(2000),它们的相关公开内容通过引用并入本文。在一些实施方案中,四环包含在带切口的四环结构内。

[0089] 带切口的四环结构

[0090] "带切口的四环结构"是RNAi寡核苷酸的结构,其特征在于存在单独的正义(过客)

链和反义(引导)链,其中正义链具有与反义链互补的区域,并且其中这些链中的至少一条链(通常为正义链)具有四环,该四环被配置为稳定在该至少一条链内形成的相邻茎区。

[0091] 反义寡核苷酸

[0092] 如本文所用,术语“反义寡核苷酸”被定义为能够通过与靶核酸、特别是与靶核酸上的连续序列杂交来调节靶基因的表达的寡核苷酸。反义寡核苷酸基本上不为双链的,因此不为siRNA或shRNA。优选地,本发明的反义寡核苷酸为单链的。应当理解的是,本发明的单链寡核苷酸可以形成发夹或分子间双链体结构(同一寡核苷酸的两个分子之间的双链体),只要其内部或相互间的自身互补程度小于寡核苷酸全长的50%。

[0093] 优选地,本发明的单链反义寡核苷酸不包含RNA核苷,因为这将降低核酸酶抗性。

[0094] 有利的是,本发明的反义寡核苷酸包含一个或多个经修饰的核苷或核苷酸,诸如2’糖修饰的核苷。此外,优选的是未修饰的核苷是DNA核苷。

[0095] 连续核苷酸序列

[0096] 术语“连续核苷酸序列”是指寡核苷酸的与靶核酸互补的区域。该术语在本文中与术语“连续核碱基序列”和术语“寡核苷酸基序序列”可互换使用。在一些实施方案中,寡核苷酸的所有核苷酸构成连续核苷酸序列。在一些实施方案中,寡核苷酸包含连续核苷酸序列,例如F-G-F’缺口聚体(gapmer)区,并且可以任选地包含其他核苷酸,例如可以用于将官能团附接于连续核苷酸序列的核苷酸接头区。核苷酸接头区域可与靶核酸互补或不互补。应理解的是,该寡核苷酸的邻接核苷酸序列不能比寡核苷酸本身更长,并且该寡核苷酸不能比邻接核苷酸序列更短。

[0097] 核苷酸

[0098] 核苷酸为寡核苷酸和多核苷酸的结构单元,并且出于本发明的目的,包括天然存在的和非天然存在的核苷酸。在自然界中,核苷酸,诸如DNA和RNA核苷酸包含核糖糖部分、核碱基部分和一个或多个磷酸基团(其不存在于核苷中)。核苷和核苷酸也可以可互换地称为“单元”或“单体”。

[0099] 脱氧核糖核苷酸

[0100] 如本文所用,术语“脱氧核糖核苷酸”是指与核糖核苷酸相比,在其戊糖的2’位置具有氢代替羟基的核苷酸。修饰的脱氧核糖核苷酸是在2’位置以外具有原子的一个或多个修饰或取代(包括糖、磷酸酯基团或碱基中的修饰或取代或者糖、磷酸酯基团或碱基的修饰或取代)的脱氧核糖核苷酸。

[0101] 核糖核苷酸

[0102] 如本文所用,术语“核糖核苷酸”是指具有核糖作为其戊糖的核苷酸,该戊糖在其2’位置含有羟基。修饰的核糖核苷酸是在2’位置以外具有原子的一个或多个修饰或取代(包括核糖、磷酸酯基团或碱基中的修饰或取代或者核糖、磷酸酯基团或碱基的修饰或取代)的核糖核苷酸。

[0103] 修饰的核苷

[0104] 如本文所用,术语“修饰的核苷”或“核苷修饰”是指与等同的DNA或RNA核苷相比,通过引入糖部分或(核)碱基部分的一种或多种修饰而被修饰的核苷。在一个优选实施方案中,修饰的核苷包含修饰的糖部分。术语修饰的核苷在本文中还可与术语“核苷类似物”或修饰的“单元”或修饰的“单体”互换使用。具有未修饰的DNA或RNA糖部分的核苷在本文中被

称为DNA或RNA核苷。在DNA或RNA核苷的碱基区域中具有修饰的核苷如果允许沃森克里克(Watson Crick)碱基配对,则通常仍称为DNA或RNA。

[0105] 修饰的核苷酸

[0106] 如本文所用,术语“修饰的核苷酸”是指与选自以下项的对应的参考核苷酸相比具有一个或多个化学修饰的核苷酸:腺嘌呤核糖核苷酸、鸟嘌呤核糖核苷酸、胞嘧啶核糖核苷酸、尿嘧啶核糖核苷酸、腺嘌呤脱氧核糖核苷酸、鸟嘌呤脱氧核糖核苷酸、胞嘧啶脱氧核糖核苷酸和胸苷脱氧核糖核苷酸。在一些实施方案中,修饰的核苷酸是非天然存在的核苷酸。在一些实施方案中,修饰的核苷酸在其糖、核碱基和/或磷酸酯基团中具有一个或多个化学修饰。在一些实施方案中,修饰的核苷酸具有与对应的参考核苷酸缀合的一个或多个化学部分。通常,修饰的核苷酸赋予其中存在修饰的核苷酸的核酸一个或多个期望的特性。例如,修饰的核苷酸可以改善热稳定性、抗降解性、核酸酶抗性、溶解度、生物利用度、生物活性、降低的免疫原性等。

[0107] 修饰的核苷间键(internucleoside linkage)

[0108] 如技术人员通常所理解的,术语“修饰的核苷间键”定义为除磷酸二酯(PO)键以外的键,其将两个核苷共价偶联在一起。因此,本发明的寡核苷酸可包含修饰的核苷间键。在一些实施方案中,与磷酸二酯键相比,修饰的核苷间键增加了寡核苷酸的核酸酶抗性。对于天然存在的寡核苷酸,核苷间键包括在相邻核苷之间产生磷酸二酯键的磷酸基团。修饰的核苷间键可用于稳定体内使用的寡核苷酸,并可用于防止本发明的寡核苷酸中DNA核苷区域或RNA核苷区域的核酸酶裂解,例如在缺口聚体寡核苷酸的缺口区域G内以及在修饰的核苷区域中,例如区域F和F’。

[0109] 在一个实施方案中,寡核苷酸包含一个或多个从天然磷酸二酯修饰的核苷间键,诸如一个或多个修饰的核苷间键,其例如对核酸酶的攻击更具抗性。核酸酶抗性可以通过在血清中孵育寡核苷酸或通过使用核酸酶抗性测定(例如蛇毒磷酸二酯酶(SVPD))来确定,两者均是本领域中众所周知的。能够增强寡核苷酸的核酸酶抗性的核苷间键称为抗核酸酶核苷间键。在一些实施方案中,寡核苷酸或其连续核苷酸序列中至少50%的核苷间键是经修饰的,诸如至少60%、诸如至少70%、诸如至少75%、诸如至少80%或诸如至少90%的寡核苷酸或其连续核苷酸序列中的核苷间键是经修饰的。在一些实施方案中,寡核苷酸或其连续核苷酸序列的所有核苷间键是经修饰的。应当认识到的是,在一些实施方案中,将本发明的寡核苷酸与非核苷酸官能团诸如缀合物连接的核苷可以是磷酸二酯。在一些实施方案中,寡核苷酸的所有核苷间键或其连续核苷酸序列都是抗核酸酶核苷间键。

[0110] 有利的是在本发明的寡核苷酸中使用硫代磷酸酯核苷间键。

[0111] 硫代磷酸酯核苷间键由于核酸酶抗性、有益的药代动力学和易于制造而特别有用。在一些实施方案中,寡核苷酸或其连续核苷酸序列中至少50%的核苷间键是硫代磷酸酯,诸如至少60%、诸如至少70%、诸如至少75%、诸如至少80%或诸如至少90%的寡核苷酸或其连续核苷酸序列中的核苷间键是硫代磷酸酯。在一些实施方案中,寡核苷酸的所有核苷间键或其连续核苷酸序列是硫代磷酸酯。

[0112] 在一些实施方案中,除了二硫代磷酸酯键(phosphorothioate linkage)外,本发明的寡核苷酸包含硫代磷酸酯核苷间键及至少一个磷酸二酯键,诸如2、3或4个磷酸二酯键。在缺口聚体寡核苷酸中,磷酸二酯键(当存在时)适当地不位于缺口区域G中的连续DNA

核苷之间。

[0113] 抗核酸酶键诸如硫代磷酸酯键在与靶核酸形成双链体时能够募集核酸酶的寡核苷酸区域中特别有用，诸如缺口聚体的区域G。然而，硫代磷酸酯键还可用于非核酸酶募集区域和/或亲和力增强区域，诸如缺口聚体的区域F和F'。在一些实施方案中，缺口聚体寡核苷酸可在区域F或F'，或者同时在区域F和F'中包含一个或多个磷酸二酯键，其中区域G中的所有核苷间键均可以是硫代磷酸酯。

[0114] 优选地，寡核苷酸的连续核苷酸序列的所有核苷间键都是硫代磷酸酯，或寡核苷酸的所有核苷间键都是硫代磷酸酯键。特别是，反义寡核苷酸的连续核苷酸序列的所有核苷间键都是硫代磷酸酯，或反义寡核苷酸的所有核苷间键都是硫代磷酸酯键。

[0115] 应当认识到，如EP 2 742 135中所公开的，治疗性寡核苷酸可包含其他核苷间键(除磷酸二酯和硫代磷酸酯以外)，例如烷基膦酸酯/甲基膦酸酯核苷间，其根据EP 2 742 135可例如以其他方式在DNA硫代磷酸酯的间隔区中被耐受。

[0116] 核碱基

[0117] 术语核碱基包括存在于核苷和核苷酸中的嘌呤(例如腺嘌呤和鸟嘌呤)和嘧啶(例如尿嘧啶、胸腺嘧啶和胞嘧啶)部分，其在核酸杂交中形成氢键。在本发明的上下文中，术语核碱基还包括修饰的核碱基，其可不同于天然存在的核碱基，但在核酸杂交过程中为功能性的。在此上下文中，“核碱基”是指天然存在的核碱基，诸如腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸苷、尿嘧啶、黄嘌呤和次黄嘌呤，以及非天然存在的变体。此类变体例如描述于Hirao等人(2012)，Accounts of Chemical Research，第45卷第2055页和Bergstrom(2009)Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry，增刊37 1.4.1中。

[0118] 在一些实施方案中，通过以下方式修饰核碱基部分：将嘌呤或嘧啶改变为修饰的嘌呤或嘧啶，诸如取代的嘌呤或取代的嘧啶，诸如选自异胞嘧啶、假异胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、5-噻唑并-胞嘧啶、5-丙炔基-胞嘧啶、5-丙炔基-尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-噻唑并-尿嘧啶、2-硫代-尿嘧啶、2'-硫代-胸腺嘧啶、肌苷、二氨基嘌呤、6-氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、2,6-二氨基嘌呤和2-氯-6-氨基嘌呤的核碱基。

[0119] 核碱基部分可由每个相应核碱基的字母代码来表示，例如A、T、G、C或U，其中每个字母可任选地包括具有同等功能的修饰的核碱基。例如，在示例性的寡核苷酸中，核碱基部分选自A、T、G、C和5-甲基胞嘧啶。任选地，对于LNA缺口聚物，可使用5-甲基胞嘧啶LNA核苷。

[0120] 修饰的寡核苷酸

[0121] 术语修饰的寡核苷酸描述了包含一个或多个糖修饰的核苷和/或修饰的核苷间键的寡核苷酸。术语“嵌合”寡核苷酸为已在文献中用于描述具有修饰的核苷的寡核苷酸的术语。

[0122] 互补性

[0123] 如本文所用，术语“互补的”是指两个核苷酸之间(例如，在两个相对的核酸上或在单个核酸链的相对区域上)或两个核苷酸序列之间的结构关系，其允许两个核苷酸或两个核苷酸序列彼此形成碱基对。例如，与相对核酸的嘧啶核苷酸互补的一个核酸的嘌呤核苷酸可以通过彼此形成氢键而碱基配对在一起。在一些实施方案中，互补核苷酸可以Watson-Crick方式或以允许形成稳定双链体的任何其他方式碱基配对。沃森克里克碱基对为鸟嘌呤(G)-胞嘧啶(C)和腺嘌呤(A)-胸腺嘧啶(T)/尿嘧啶(U)。应当理解，寡核苷酸可包含具有

修饰的核碱基的核苷,例如经常使用5-甲基胞嘧啶代替胞嘧啶,因此,术语互补性涵盖未修饰的核碱基和修饰的核碱基之间的沃森克里克碱基配对(参见例如Hirao等人(2012)Accounts of Chemical Research,第45卷第2055页和Bergstrom(2009)Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry,增刊37 1.4.1)。

[0124] 如本文所用,术语“互补性百分比”是指跨连续核苷酸序列的核酸分子(例如寡核苷酸)中连续核苷酸序列的与参考序列(例如靶序列或序列基序)互补的核苷酸比例(以百分比表示)。因此,通过计数两个序列之间(当与靶序列5’-3’和3’-5’的寡核苷酸序列比对时)互补(形成例如Watson Crick碱基对)的对准的核碱基数,将该数除以寡核苷酸中核苷酸的总数,然后乘以100,来计算互补性的百分比。在此类比较中,未对准(例如形成碱基对)的核碱基/核苷酸被称为错配。在计算连续核苷酸序列的互补性百分比时,不允许插入和删除。应当理解的是,在确定互补性时,只要保留了形成例如Watson Crick碱基配对的核碱基的功能能力,就不考虑核碱基的化学修饰(例如,认为5’-甲基胞嘧啶与用于计算同一性百分比目的的胞嘧啶相同)。

[0125] 术语“完全互补”是指100%互补性。

[0126] 以下是与HBV转录物的区域完全互补的连续核苷酸序列的实例。

[0127] 以下是与HBV靶标的区域(SEQ ID NO:28)完全互补的连续核苷酸序列(SEQ ID NO:6)的实例。

[0128] SEQ ID NO:28:

[0129]
```
cctctctttacgcggactccccgtctgtgccttctcatctgccggaccgtgtgcacttcgcttcacctc
                        ||||||||||||||||
SEQ ID NO:6:       3′GGCAGACACGGAAGAG 5′
```

[0130] 在一些实施方案中,如本文所述,两个核酸可具有彼此互补以形成互补区的多个核苷酸的区域。

[0131] 互补区

[0132] 如本文所用,术语“互补区”是指与核苷酸的反平行序列充分互补以允许在适当的杂交条件下(例如,在磷酸酯缓冲液中,在细胞中等)两个核苷酸序列之间的杂交的核酸的核苷酸序列(例如,双链寡核苷酸)。

[0133] 同一性

[0134] 如本文所用,术语“同一性”是指跨连续核苷酸序列的核酸分子(例如寡核苷酸)中连续核苷酸序列的与参考序列(例如序列基序)相同的核苷酸比例(以百分比表示)。因此,通过计数两个序列(在本发明的化合物的连续核苷酸序列中和在参考序列中)相同(匹配)的对准核碱基数,将该数除以寡核苷酸的核苷酸总数再乘以100,来计算同一性百分比。因此,同一性百分比=(匹配数x 100)/比对区域的长度(例如,连续核苷酸序列)。在计算连续核苷酸序列的同一性百分比时,不允许插入和删除。应当理解的是,在确定同一性时,只要保留了形成Watson Crick碱基配对的核碱基的功能能力,就不考虑核碱基的化学修饰(例如,在计算同一性百分比时,认为5-甲基胞嘧啶与胞嘧啶相同)。

[0135] 杂交

[0136] 如本文所用,术语“杂交”(hybridizing/hybridizes)应当理解为两条核酸链(例如寡核苷酸和靶核酸)在相反链上的碱基对之间形成氢键,从而形成双链体。两条核酸链之间结合的亲和力为杂交的强度。它通常根据解链温度(T_m)来描述,该解链温度被定义为一

半寡核苷酸与靶核酸形成双链体的温度。在生理条件下，T_m并非确实与亲和力严格成比例(Mergny与Lacroix,2003年,Oligonucleotides 13:515-537)。标准状态的吉布斯自由能ΔG°更精确地表示结合亲和力，并且通过ΔG°＝-RTln(K_d)与反应的解离常数(K_d)相关，其中R为气体常数，T为绝对温度。因此，寡核苷酸与靶核酸之间的反应的非常低的ΔG°反映了寡核苷酸与靶核酸之间的强杂交。ΔG°是与水浓度为1M、pH为7、温度为37℃的反应相关的能量。寡核苷酸与靶核酸的杂交是自发反应，而自发反应的ΔG°小于零。ΔG°可经由实验来测量，例如，利用如Hansen等人,1965,Chem.Comm.36-38和Holdgate等人,2005,Drug Discov Today中所述的等温滴定量热法(ITC)方法测量。技术人员将知道商用设备可用于ΔG°测量。ΔG°还可以使用SantaLucia,1998,Proc Natl Acad Sci USA.中描述的最近邻模型，95:1460-1465描述的最近邻居模型，使用由Sugimoto等人,1995,Biochemistry 34:11211-11216和McTigue等人,2004,Biochemistry 43:5388-5405描述的适当推导的热力学参数进行数值评估。为了具有通过杂交调节其预期的核酸靶标的可能性，对于长度为10-30个核苷酸的寡核苷酸，本发明的寡核苷酸与靶核酸以低于-10kcal的估计ΔG°杂交。在一些实施方案中，杂交的程度或强度通过标准状态吉布斯自由能ΔG°测量。对于长度为8-30个核苷酸的寡核苷酸，寡核苷酸可与靶核酸以低于-10kcal、诸如低于-15kcal、诸如低于-20kcal和诸如低于-25kcal的估计ΔG°杂交。在一些实施方案中，寡核苷酸以-10kcal至-60kcal、诸如-12kcal至-40kcal、诸如-15kcal至-30kcal或-16kcal至-27kcal诸如-18kcal至-25kcal的ΔG°估值与靶核酸杂交。

[0137] 靶核酸

[0138] 根据本发明，靶核酸是编码乙型肝炎病毒的核酸，并且可以例如是基因、RNA、mRNA、病毒mRNA或cDNA序列。靶核酸由SEQ ID NO:1及其天然存在的变体表示。

[0139] 对于体内或体外应用，本发明的寡核苷酸通常能够抑制表达HBV靶核酸的细胞中HBV靶核酸的表达。本发明的寡核苷酸的核碱基的连续序列在寡核苷酸长度上测量的结果通常是与HBV靶核酸为互补，任选的是有一个或两个错配的例外，并且任选的是不包含能将寡核苷酸联接至例如缀合物等任选官能基团或其他非互补末端核苷酸(例如区域D'或D")的基于核苷酸的接头区。

[0140] 靶序列

[0141] 如本文所用，术语"靶序列"是指存在于靶核酸中的核苷酸序列，其包含与本发明的寡核苷酸互补的核碱基序列。在一些实施方案中，靶序列由靶核酸上具有与本发明寡核苷酸的连续核苷酸序列互补的核碱基序列的区域组成。靶核酸的这一区域可以互换地称为靶标核苷酸序列、靶序列或靶标区域。在一些实施方案中，靶序列比单个寡核苷酸的互补序列更长，并且可以例如代表靶核酸的优选区域，其可以被本发明的几种寡核苷酸靶向。

[0142] 本文描述的是治疗性寡核苷酸的HBV mRNA靶区，其由SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:28的第1530至第1602位的序列表示。该靶区可被分成更小的靶序列并选自由以下项组成的组：SEQ ID NO:1的第1530位至第1602位、第1530位至第1598位、第1530位至第1543位、第1530位至第1544位、第1531位至第1543位、第1551位至第1565位、第1551位至第1566位、第1577位至第1589位、第1577位至第1591位、第1577位至第1592位、第1578位至第1590位、第1578位至第1592位、第1583位至第1598位、第1584位至第1598位、第1585位至第1598位或第1583位至第1602位。

[0143] 在一个实施方案中，本发明的治疗性寡核苷酸包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:28的从第1530位至第1602位的靶序列互补或杂交的连续核苷酸序列。特别是与选自由1530-1544、1531-1543、1585-1598和1583-1602组成的组的靶序列互补或杂交。

[0144] 与反义寡核苷酸互补或杂交的靶序列通常包含至少10个核苷酸的连续核碱基序列。靶区的连续核苷酸序列介于10个至50个核苷酸，诸如12个至30个、诸如14个至20个、诸如15个至18个连续核苷酸。

[0145] 靶细胞

[0146] 如本文所用，术语“靶细胞”是指表达靶核酸的细胞。在一些实施方案中，靶细胞可以是体内或体外的。在一些实施方案中，靶细胞是感染HBV的哺乳动物细胞，诸如啮齿动物细胞，诸如小鼠细胞或人细胞，特别是感染HBV的肝细胞。

[0147] 在优选的实施方案中，靶细胞表达HBV mRNA并分泌HBsAg和HBeAg。

[0148] 肝细胞

[0149] 如本文所用，术语“肝细胞(hepatocyte)”或“肝细胞(hepatocytes)”是指肝实质组织的细胞。这些细胞约占肝质量的70％-85％，并制造血清白蛋白、纤维蛋白原和凝血因子(因子3和因子4除外)的凝血酶原组。肝细胞谱系细胞的标志物可包括但不限于：运甲状腺素蛋白(Ttr)、谷氨酰胺合成酶(Glul)、肝细胞核因子1a(Hnf1a)和肝细胞核因子4a(Hnf4a)。成熟肝细胞的标志物可包括但不限于：细胞色素P450(Cyp3a11)、延胡索酰乙酰乙酸水解酶(Fah)、6-磷酸葡萄糖(G6p)、白蛋白(Alb)和OC2-2F8。参见，例如，Huch等人，(2013)，Nature，494(7436)：247-250，其与肝细胞标志物有关的内容通过引用并入本文。

[0150] 减少的表达

[0151] 如本文所用，术语基因的“减少的表达”是指与适当的参考细胞或受试者相比，细胞或受试者中基因编码的RNA转录物或蛋白质的量减少和/或基因的活性的量减少。例如，用药物组合或双链寡核苷酸(例如，具有与HBsAg mRNA序列互补的反义链的双链寡核苷酸)处理细胞的行为可导致RNA转录物、蛋白质和/或酶活性(例如，由HBV基因组的S基因编码)的量分别相比于未用药物组合或双链寡核苷酸处理的细胞减少。类似地，本文所用的“减少表达”是指导致基因(例如，HBV基因组的S基因)表达减少的行为。

[0152] 天然存在的变体

[0153] 术语“其天然存在的变体”是指靶核酸的天然存在于定义的分类群内的变体，诸如HBV基因型A-H。通常，当提及多核苷酸的“天然存在的变体”时，该术语还可涵盖被发现通过染色体易位或复制来编码基因组DNA的靶序列的任何等位基因变体，以及RNA，例如衍生自其的mRNA。“天然存在的变体”还可包括衍生自靶序列mRNA的另选剪接的变体。当提及例如特定多肽序列时，该术语还包括蛋白质的天然存在的形式，其因此可例如通过共翻译修饰或翻译后修饰(诸如信号肽裂解、蛋白水解裂解、糖基化等)进行处理。

[0154] 高亲和力修饰的核苷

[0155] 高亲和力修饰的核苷是修饰的核苷酸，其在掺入到寡核苷酸中时，增强了寡核苷酸对其互补靶标的亲和力，例如通过解链温度(T_m)测量。本发明的高亲和力修饰的核苷优选地使每一个修饰的核苷的解链温度增加介于+0.5℃至+12℃之间，更优选地介于+1.5℃至+10℃之间并且最优选地介于+3℃至+8℃之间。许多高亲和力修饰的核苷是本领域已知的，并且包括例如许多2’取代的核苷以及锁定的核酸(LNA)(参见例如Freier&Altmann；

Nucl.Acid Res.,1997,25,4429-4443和Uhlmann;Curr.Opinion in Drug Development,2000,3(2),293-213)。

[0156] 糖修饰

[0157] 本发明的寡聚物可包含一个或多个具有修饰的糖部分(即当与DNA和RNA中发现的核糖糖部分相比时糖部分的修饰)的核苷。

[0158] 已经制备了许多具有核糖糖部分的修饰的核苷,主要目的为改善寡核苷酸的某些特性,诸如亲和力和/或核酸酶抗性。

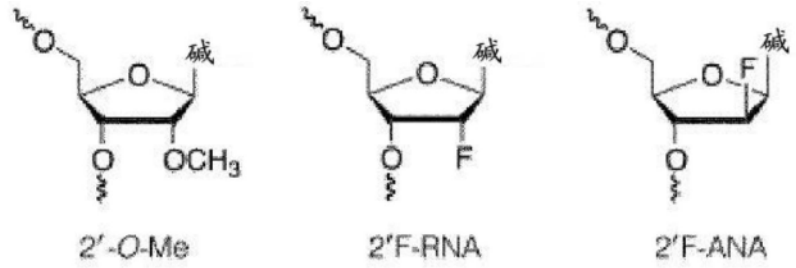
[0159] 这样的修饰包括其中核糖环结构被修饰的那些修饰,例如,通过用己糖环(HNA)或双环替换核糖环结构来实现,其通常在核糖环(LNA)的C2和C4碳原子之间具有双基桥,或通常在C2和C3之间缺乏键的未连接核糖环(例如UNA)。其他糖修饰的核苷包括,例如,双环己糖核酸(WO2011/017521)或三环核酸(WO2013/154798)。修饰的核苷还包括其中糖部分被非糖部分替换的核苷,例如在肽核酸(PNA)或吗啉代核酸的情况下。

[0160] 糖修饰还包括通过将核糖环上的取代基改变为除氢以外的基团或DNA和RNA核苷中天然存在的2'-OH基团而进行的修饰。例如,可在2'、3'、4'或5'位置引入取代基。

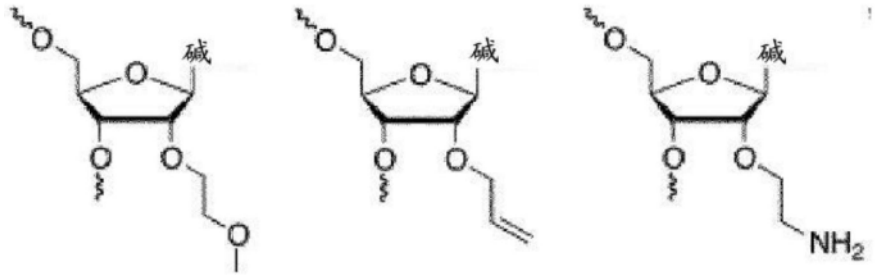
[0161] 2'糖修饰的核苷

[0162] 2'糖修饰的核苷是一种核苷,其在2'位置具有除H或-OH以外的取代基(2'取代的核苷)或包含能够在2'碳与核糖环中的第二个碳原子之间形成桥的2'连接双基,诸如LNA(2'-4'双基桥连)核苷。

[0163] 事实上,人们已花费很多精力开发2'糖取代的核苷,并且发现许多2'取代的核苷掺入寡核苷酸后具有有益的特性。例如,2'修饰的糖可提供对寡核苷酸的增强的结合亲和力和/或增加的核酸酶抗性。2'取代的修饰的核苷的实例是2'-O-烷基-RNA、2'-O-甲基-RNA、2'-烷氧基-RNA、2'-O-甲氧基乙基-RNA(MOE)、2'-氨基-DNA、2'-氟-RNA和2'-F-ANA核苷。有关进一步的实例,请参见例如Freier&Altmann;Nucl.Acid Res.,1997,25,4429-4443和Uhlmann;Curr.Opinion in Drug Development,2000,3(2),293-213以及Deleavey和Damha,Chemistry and Biology 2012,19,937。下面为一些2'取代的修饰的核苷的示意图。



[0164]



[0165] 关于本发明,2'取代的糖修饰的核苷不包括像LNA那样的2'桥连的核苷。

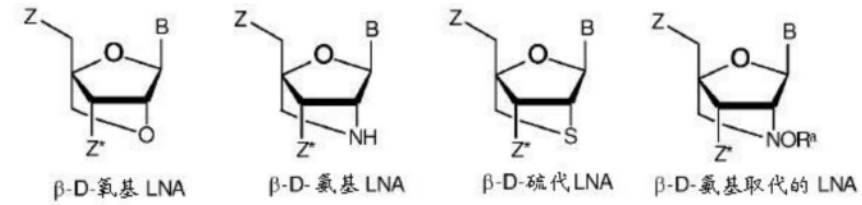
[0166] 锁定的核酸核苷(LNA核苷)

[0167] "LNA核苷"为2'-修饰的核苷,其包含联接所述核苷的核糖糖环的C2'和C4'的双基(也称为"2'-4'桥"),其限制或锁定核糖环的构象。这些核苷在文献中也被称为桥连核酸或双环核酸(BNA)。当将LNA掺入互补RNA或DNA分子的寡核苷酸中时,核糖构象的锁定与杂交亲和力的增强(双链体稳定化)相关。这可通过测量寡核苷酸/互补双链体的解链温度来常规确定。

[0168] 非限制性的示例性LNA核苷公开于WO 99/014226、WO 00/66604、WO 98/039352、WO 2004/046160、WO 00/047599、WO 2007/134181、WO 2010/077578、WO 2010/036698、WO 2007/090071、WO 2009/006478、WO 2011/156202、WO 2008/154401、WO 2009/067647、WO 2008/150729、Morita等人,Bioorganic&Med.Chem.Lett.12,73-76,Seth等人J.Org.Chem.2010,Vol 75(5)pp.1569-81和Mitsuoka等人,Nucleic Acids Research 2009,37(4),1225-1238和Wan和Seth,J.Medical Chemistry 2016,59,9645-9667中。

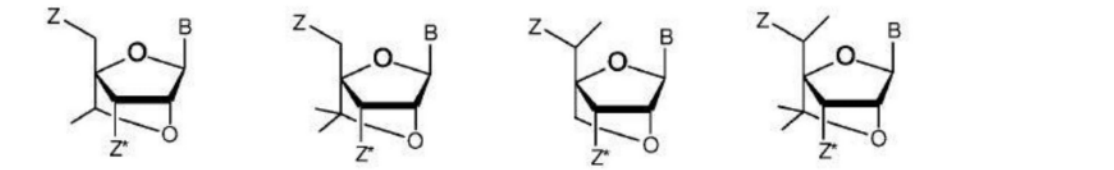
[0169] 其他非限制性的示例性LNA核苷公开于方案1中。

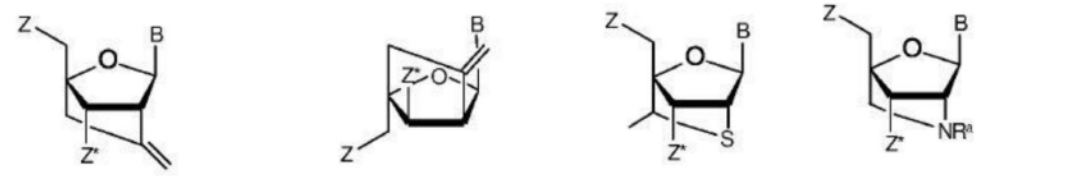
[0170] 方案1:

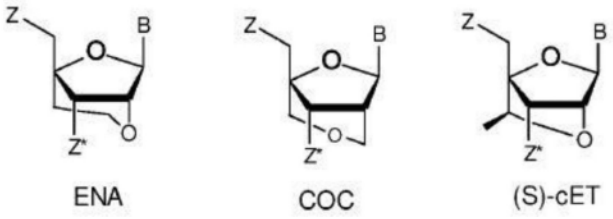




[0171]







[0172] 特定的LNA核苷是β-D-氧基-LNA、6'-甲基-β-D-氧基LNA诸如(S)-6'-甲基-β-D-氧基-LNA(ScET)和ENA。一种特别有利的LNA是β-D-氧基-LNA。

[0173] 磷酸类似物

[0174] 如本文所用,术语"磷酸类似物"是指模拟磷酸酯基团的静电和/或空间特性的化学部分。在一些实施方案中,磷酸类似物位于寡核苷酸的5'末端核苷酸处代替通常易于酶促去除的5'-磷酸酯。在一些实施方案中,5'磷酸类似物含有抗磷酸酶的键。磷酸类似物的实例包括5'膦酸酯,诸如5'亚甲基膦酸酯(5'-MP)和5'-(E)-乙烯基膦酸酯(5'-VP)。在一些实施方案中,寡核苷酸在5'-末端核苷酸的糖的4'-碳位置处具有磷酸类似物(称为"4'-磷酸类似物")。4'-磷酸类似物的实例是氧甲基膦酸酯,其中氧甲基的氧原子结合到糖部分(例如,在其4'-碳上)或其类似物。参见,例如,2016年9月2日提交的美国临时申请号62/383,207和2016年9月12日提交的美国临时申请号62/393,401,其各自涉及磷酸类似物的内容通过引用并入本文。已经开发了针对寡核苷酸的5'端的其他修饰(参见,例如,WO 2011/133871;美国专利号8,927,513;和Prakash等人(2015),Nucleic Acids Res.,43(6):2993-

3011,其各自涉及磷酸类似物的内容通过引用并入本文)。

[0175] 核酸酶介导的降解

[0176] 核酸酶介导的降解意指一寡核苷酸能够在与互补核苷酸序列形成双链体时,居中影响所述序列的降解。

[0177] 在一些实施方案中,反义寡核苷酸可经由靶核酸的核酸酶介导的降解而发挥作用,其中本发明的寡核苷酸能够募集核酸酶,特别是核酸内切酶,优选地核糖核酸酶(RNase),例如RNase H。经由核酸酶介导的机制而运作的寡核苷酸设计实例是这样的寡核苷酸,该寡核苷酸通常包含至少5个或6个连续DNA核苷的区域,并且在该区域的一侧或两侧上侧接有亲和力增强核苷,例如缺口聚体、头聚物及尾聚物。

[0178] RNase H活性和募集

[0179] 在一个实施方案中,治疗性寡核苷酸是能够募集RNase H的反义寡核苷酸。反义寡核苷酸的RNase H活性是指其在与互补RNA分子形成双链体时募集RNase H的能力。WO01/23613提供了用于确定RNase H活性的体外方法,该方法可用于确定募集RNase H的能力。如果寡核苷酸在提供互补靶核酸序列时具有的初始速率(以pmol/l/min计)是当使用具有与正被测试的修饰的寡核苷酸相同的碱基序列但仅包含在寡核苷酸中所有单体之间均具有硫代磷酸酯键的DNA单体的寡核苷酸并且使用由WO01/23613(通过引用并入本文)的实例91至95提供的方法时确定的初始速率的至少5%,诸如至少10%或超过20%,则通常认为该寡核苷酸能够募集RNase H。为了用于测定RNase H活性,可从Lubio Science GmbH,Lucerne,Switzerland获得重组人RNase H1。

[0180] 缺口聚体

[0181] 在本发明的治疗性寡核苷酸为反义寡核苷酸的一些实施方案中,本发明的核酸分子或其连续核苷酸序列为缺口聚体反义寡核苷酸。反义缺口聚体一般用于通过RNase H介导的降解来抑制靶核酸。在本发明的一个实施方案中,本发明的寡核苷酸能够募集RNase H。

[0182] 缺口聚体反义寡核苷酸包含至少三个不同的结构区:‘5->3’方向的5’-侧翼、缺口和3’-侧翼F-G-F’。“缺口”区域(G)包含一段使寡核苷酸能够募集RNase H的连续DNA核苷酸。该缺口区域的侧翼是包含一个或多个糖修饰的核苷(优选地是高亲和力糖修饰的核苷)的5’侧翼区域(F),以及包含一个或多个糖修饰的核苷(优选地是高亲和力糖修饰的核苷)的3’侧翼区域(F’)。区域F和F’中的一个或多个糖修饰的核苷增强寡核苷酸对靶核酸的亲和力(即,亲和力增强的糖修饰的核苷)。在一些实施方案中,区域F和F’中的一个或多个糖修饰的核苷是2’糖修饰的核苷,诸如高亲和力的2’糖修饰,诸如独立地选自LNA和2’-MOE。

[0183] 在缺口聚体设计中,缺口区域的5’和3’最末端核苷是DNA核苷,分别位于5’(F)或3’(F’)区域的糖修饰核苷附近。侧翼可进一步定义为在距缺口区域最远的端,即在5’侧翼的5’端和3’侧翼的3’端,具有至少一个糖修饰的核苷。

[0184] 区域F-G-F’形成连续核苷酸序列。本发明的反义寡核苷酸或其连续核苷酸序列可包含式F-G-F’的缺口聚体区域。

[0185] 缺口聚体设计F-G-F’的总长度可以为例如12个至30个核苷,诸如13个至24个核苷,诸如14个至22个核苷,诸如13个至17个核苷,诸如14个至16个核苷。

[0186] 举例而言,本发明的缺口聚体寡核苷酸可由下式代表:

[0187] F_{1-6}-G_{6-16}-F'_{1-6}，诸如

[0188] F_{1-4}-G_{7-10}-F'_{2-4}

[0189] 前提条件是缺口聚体区域F-G-F'的总长度至少为12，诸如至少13个核苷酸。

[0190] 在本发明的方面，反义寡核苷酸或其连续核苷酸序列由式5'-F-G-F'-3'的缺口聚体组成或包含该式的缺口聚体，其中区F和F'独立地包含1个至8个核苷或由这些核苷组成，其中1个至4个核苷经2'糖修饰且定义F和F'区的5'和3'端，并且G为能够募集RNase H的介于6个至16个核苷之间的区域。

[0191] 在本发明的一个实施方案中，连续核苷酸序列是式5'-F-G-F'-3'的缺口聚体，其中区F和F'独立地包含2个至4个经2'糖修饰且定义F和F'区的5'和3'端的核苷酸，并且G为能够募集RNase H的介于6个至10个DNA核苷之间的区域。

[0192] 在一些实施方案中，缺口区域G可由6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16个连续硫代磷酸酯连接的DNA核苷组成。在一些实施方案中，缺口区域G由7个至10个DNA核苷组成。在一些实施方案中，缺口中的所有核苷间键是硫代磷酸酯键。

[0193] 在一些实施方案中，区域F和F'独立地由糖修饰的核苷的连续序列组成或包含糖修饰的核苷的连续序列。在一些实施方案中，区域F的糖修饰的核苷可独立地选自2'-O-烷基-RNA单元、2'-O-甲基-RNA、2'-氨基-DNA单元、2'-氟-DNA单元、2'-烷氧基-RNA、MOE单元、LNA单元、阿拉伯糖核酸(ANA)单元和2'-氟-ANA单元。

[0194] 在一些实施方案中，区域F或F'或者F和F'的所有核苷均为LNA核苷，诸如独立地选自β-D-氧基LNA、ENA或ScET核苷。在一些实施方案中，区域F由1-5个，诸如2-4个、诸如3-4个、诸如1个、2个、3个、4个或5个连续LNA核苷组成。在一些实施方案中，区域F和F'的所有核苷都是β-D-氧基LNA核苷。

[0195] 在一些实施方案中，区域F或F'或者F和F'的所有核苷都是2'取代的核苷，诸如OMe或MOE核苷。在一些实施方案中，区域F由1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个或8个连续OMe或MOE核苷组成。在一些实施方案中，仅一个侧翼区域可以由2'取代的核苷，诸如OMe或MOE核苷组成。在一些实施方案中，5'(F')侧翼区域由2'取代的核苷，诸如OMe或MOE核苷组成，而3'(F)侧翼区域包含至少一个LNA核苷，诸如β-D-氧基LNA核苷或cET核苷。在一些实施方案中，3'(F')侧翼区域由2'取代的核苷，诸如OMe或MOE核苷组成，而5'(F)侧翼区域包含至少一个LNA核苷，诸如β-D-氧基LNA核苷或cET核苷。

[0196] 其他缺口聚体设计公开于WO2004/046160、WO2007/146511和WO2008/113832中，这些专利在此以引用方式并入。

[0197] LNA缺口聚体

[0198] LNA缺口聚体是其中区域F和F'中的一者或两者包含LNA核苷或由LNA核苷组成的缺口聚体。β-D-氧基缺口聚体是其中区域F和F'中的一者或两者包含β-D-氧基LNA核苷或由其组成的缺口聚体。

[0199] 在一些实施方案中，LNA缺口聚体具有下式：$[LNA]_{1-5}$-[区域G]$_{6-10}$-$[LNA]_{1-5}$，其中区域G具有如在缺口聚体区域G定义中的定义。

[0200] MOE缺口聚体

[0201] MOE缺口聚体是其中区域F和F'由MOE核苷所构成的缺口聚体。在一些实施方案中，MOE缺口聚体的设计为$[MOE]_{1-8}$-[区域G]$_{5-16}$-$[MOE]_{1-8}$，诸如$[MOE]_{2-7}$-[区域G]$_{6-14}$-$[MOE]_{2-7}$，

诸如$[MOE]_{3-6}$-[区域G]$_{8-12}$-$[MOE]_{3-6}$，其中区域G具有如缺口聚体定义中的定义。具有5-10-5设计(MOE-DNA-MOE)的MOE缺口聚体已广泛用于本技术领域中。

[0202] 混合型翼缺口聚体

[0203] 混合型翼缺口聚体是一种LNA缺口聚体，其中区域F及F'中的一者或两者都包含2'取代的核苷，诸如独立选自以2'-O-烷基-RNA单元、2'-O-甲基-RNA、2'-氨基-DNA单元、2'-氟-DNA单元、2'-烷氧基-RNA、MOE单元、阿拉伯糖核酸(ANA)单元及2'-氟-ANA单元组成的组的2'取代核苷，诸如MOE核苷。在一些实施方案中，其中区域F和F'中的至少一者或区域F和F'两者均包含至少一个LNA核苷，区域F和F'的其余核苷独立选自以MOE和LNA组成的组。在一些实施方案中，其中区域F或F'中的至少一者或区域F和F'两者均包含至少两个LNA核苷，区域F和F'的其余核苷独立选自以MOE和LNA组成的组。在一些混合型翼的实施方案中，区域F和F'中的一者或两者可进一步包含一个或多个DNA核苷。

[0204] 混合型翼缺口聚体设计已公开于WO2008/049085及WO2012/109395，该两者在此以引用方式并入。

[0205] 寡核苷酸中的区域D'或D"

[0206] 本发明的寡核苷酸可在一些实施方案中包含或由所述寡核苷酸的所述连续核苷酸序列以及其他的5'和/或3'核苷组成，所述连续核苷酸序列与所述靶核酸互补，所述连续核苷酸序列如是缺口聚体F-G-F'。所述其他的5'和/或3'核苷可与或不与所述靶核酸为完全互补。此类其他的5'和/或3'核苷本文中可称为区域D'和D"。

[0207] 出于将连续核苷酸序列(诸如缺口聚体)与缀合物部分或另一个官能团接合的目的，可以使用添加区域D'或D"。当用于将连续核苷酸序列与缀合物部分接合时，其可用作可生物裂解的接头。另选地，其可用于提供核酸外切酶保护或使合成或制备变得容易。

[0208] 可以将区域D'和D"分别附接于区域F的5'端或区域F'的3'端，以生成下式D'-F-G-F'、F-G-F'-D"或

[0209] D'-F-G-F'-D"的设计。在这种情况下，F-G-F'是寡核苷酸的缺口聚体部分，而区域D'或D"构成寡核苷酸的单独部分。区域D'和F区之间以及区域F'和D"区之间的过渡的特征在于核苷具有朝向D'或D"区的磷酸二酯键和朝向F或F'区的硫代磷酸酯键，并且核苷被认为是缺口聚体(与靶核酸互补的连续核苷酸序列)的一部分。

[0210] 区域D'或D"可以独立地包含1个、2个、3个、4个或5个另外的核苷酸或由其组成，它们可以与靶核酸互补或不互补。与F或F'区域相邻的核苷酸不是糖修饰的核苷酸，诸如DNA或RNA或这些的碱基修饰形式。D'或D''区可用作核酸酶敏感的可生物裂解的接头(参见接头的定义)。在一些实施方案中，另外的5'和/或3'端核苷酸与磷酸二酯键联接，并且是DNA或RNA。WO2014/076195中公开了适合用作区域D'或D"的基于核苷酸的可生物裂解的接头，其包括例如磷酸二酯连接的DNA二核苷酸。在一些实施方案中，区域D'或D''与靶核酸不互补或包含与靶核酸至少50％的错配。

[0211] 在一些实施方案中，区域D'或D''包含序列AA、AT、AC、AG、TA、TT、TC、TG、CA、CT、CC、CG、GA、GT、GC或GG的二核苷酸或由这些序列的二核苷酸组成，其中C可以为5-甲基胞嘧啶，和/或T可被U替换。二核苷酸中的核苷间键是磷酸二酯键。在一些实施方案中，区域D'或D''包含序列AAA、AAT、AAC、AAG、ATA、ATT、ATC、ATG、ACA、ACT、ACC、ACG、AGA、AGT、AGC、AGG、TAA、TAT、TAC、TAG、TTA、TTT、TTC、TAG、TCA、TCT、TCC、TCG、TGA、TGT、TGC、TGG、CAA、CAT、CAC、CAG、

CTA、CTG、CTC、CTT、CCA、CCT、CCC、CCG、CGA、CGT、CGC、CGG、GAA、GAT、GAC、CAG、GTA、GTT、GTC、GTG、GCA、GCT、GCC、GCG、GGA、GGT、GGC和GGG的三核苷酸或由这些序列的三核苷酸组成，其中C可以为5-甲基胞嘧啶和/或T可以被U替换。核苷间键是磷酸二酯键。将认识到，当提及(天然存在的)核碱基A(腺嘌呤)、T(胸腺嘧啶)、U(尿嘧啶)、G(鸟嘌呤)、C(胞嘧啶)时，这些可被替代为作为等效天然核碱基发挥作用的核碱基类似物(例如与互补核苷的碱基对)。

[0212] 在一个实施方案中，本发明的反义寡核苷酸除构成缺口聚体的连续核苷酸序列外还包含区域D'和/或D"。

[0213] 在一些实施方案中，本发明的反义寡核苷酸可由下式代表：

[0214] D'-F-G-F'，特别是D'_{1-3}-F_{1-4}-G_{6-10}-F'_{2-4}

[0215] F-G-F'-D"，特别是F_{1-4}-G_{6-10}-F'_{2-4}-$D"_{1-3}$

[0216] D'-F-G-F'-D"，特别是D'_{1-3}-F_{1-4}-G_{6-10}-F'_{2-4}-$D"_{1-3}$

[0217] 在一些实施方案中，区域D'与区域F之间的核苷间键是磷酸二酯键。在一些实施方案中，区域F'与区域D"之间的核苷间键是磷酸二酯键。

[0218] 缀合物

[0219] 如本文所用，术语“缀合物”是指能够共价联接至治疗性寡核苷酸的非核苷酸部分(缀合物)，例如GalNAc簇。术语“缀合物”和“簇”或“缀合物部分”可互换使用。在一些情况下，缀合的治疗性寡核苷酸也可称为寡核苷酸缀合物。在实施方案中，缀合物为靶向配体。

[0220] 靶向配体

[0221] 如本文所用，术语“靶向配体”是指选择性地与感兴趣的组织或细胞的同源分子(例如，受体)结合并且出于将另一种物质靶向感兴趣的组织或细胞的目的可与另一种物质缀合的分子(例如，碳水化合物、氨基糖、胆固醇、多肽或脂质)。例如，在一些实施方案中，出于将寡核苷酸靶向到感兴趣的特定组织或细胞的目的，可将靶向配体缀合至寡核苷酸。在一些实施方案中，靶向配体选择性地结合至细胞表面受体。因此，在一些实施方案中，当与寡核苷酸缀合时，靶向配体通过选择性结合至细胞表面上表达的受体并由细胞对包含寡核苷酸、靶向配体和受体的复合物进行胞内体内化而促进寡核苷酸向特定细胞的递送。在一些实施方案中，靶向配体经由在细胞内化之后或期间被裂解的接头与寡核苷酸缀合，使得寡核苷酸在细胞中从靶向配体释放。

[0222] 寡核苷酸接头

[0223] 键或接头是两个原子之间的连接，其经由一个或多个共价键将一个目标化学基团或区段与另一个目标化学基团或区段联接。缀合物基团可直接或通过联接部分(例如接头或系链)附接于寡核苷酸。接头用于将缀合基团共价连接至与靶核酸互补的寡核苷酸或连续核苷酸序列。

[0224] 在本发明的一些实施方案中，治疗性寡核苷酸可任选地包含接头区，该接头区位于与靶核酸互补的寡核苷酸或连续核苷酸序列和缀合物之间。

[0225] 此类接头可以为包含生理上不稳定的键或由生理上不稳定的键组成的可生物裂解的接头，该生理上不稳定的键在哺乳动物体内通常遇到的条件或与之相似的条件下可裂解。在一个实施方案中，可生物裂解的接头对S1核酸酶裂解敏感。

[0226] 对于置于缀合物和治疗性寡核苷酸之间的可生物裂解的接头，优选的是，在靶组织(例如肌肉、肝脏、肾脏或肿瘤)中发现的裂解率大于在血清中发现的裂解率。在“材料和

方法”章节中描述了用于测定靶组织中相对于血清的裂解或通过S1核酸酶进行的裂解的水平(%)的合适方法。在一些实施方案中,当与标准品比较时,可生物裂解的接头至少约20%裂解,例如至少约30%裂解,例如至少约40%裂解,例如至少约50%裂解,例如至少约60%裂解,例如至少约70%裂解,例如至少约75%裂解。

[0227] 在优选的实施方案中,所述核酸酶易感接头包含的核苷数量在1与10之间,诸如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个核苷,更优选地是2个至6个核苷,最优选地是2个至4个相连接的核苷,所述相连接的核苷包含至少两个连续磷酸二酯键,诸如至少3个或4个或5个连续磷酸二酯键。优选地,该核苷是DNA或RNA。WO 2014/076195中更详细地描述了含有磷酸二酯的可生物裂解的接头(PO接头)(在此以引用方式并入)。

[0228] 不一定可生物裂解但主要用于将缀合物共价连接至寡核苷酸的附加的或另选的接头也可单独使用或与PO接头组合使用。不可裂解的接头可包含重复单元诸如乙二醇、氨基酸单元或氨基烷基的链结构或寡聚物。在一些实施方案中,不可裂解的接头为氨基烷基,诸如C2-C36氨基烷基,包括例如C6至C12氨基烷基。在优选的实施方案中,接头为C6氨基烷基。

[0229] 乙型肝炎病毒

[0230] 如本文所用,“乙型肝炎病毒”或“HBV”是指嗜肝病毒(Hepadnaviridae)科的成员,其具有约3,200个碱基对的小双链DNA基因组和对肝细胞的嗜性。“HBV”包括感染多种哺乳动物(例如人类、非人灵长类动物等)和鸟类(鸭等)宿主中的任何一种哺乳动物宿主的乙型肝炎病毒。“HBV”包括任何已知的HBV基因型,例如,血清型A、B、C、D、E、F和G;任何HBV血清型或HBV亚型;任何HBV分离株;HBV变体,例如,HBeAg阴性变体、耐药HBV变体(例如,拉米夫定耐药变体;阿德福韦耐药突变体;替诺福韦耐药突变体;恩替卡韦耐药突变体等);等等。

[0231] “HBV”是属于嗜肝病毒(Hepadnaviridae)科的小DNA病毒,被归类为正肝病毒(Orthohepadnavirus)属的类型物种。HBV病毒颗粒(病毒粒子)包含外部脂质包膜和由蛋白质组成的二十面体核衣壳核心。核衣壳通常包封病毒DNA和具有与逆转录病毒相似的逆转录酶活性的DNA聚合酶。HBV外膜包含嵌入的蛋白质,这些蛋白质参与病毒与易感细胞的结合并进入易感细胞。攻击肝脏的HBV已基于序列根据至少十种基因型(A-J)进行了分类。通常,基因组编码有四个基因,这些基因称为C、P、S和X。核心蛋白由基因C(HBcAg)编码,并且其起始密码子前面是产生前核心蛋白的上游框内AUG起始密码子。HBeAg是通过前核心蛋白的蛋白水解加工而产生的。DNA聚合酶由基因P编码。基因S编码表面抗原(HBsAg)。HBsAg基因是一个长的开放阅读框,但包含三个框内的“起始”(ATG)密码子,可将基因分为前S1、前S2和S三个部分。由于存在多个起始密码子,因此产生了三个不同大小的多肽,称为大、中和小(前S1+前S2+S、前S2+S或S)。它们的比例可以为1:1:4(Heermann等人,1984)。

[0232] 乙型肝炎病毒(HBV)蛋白可以组织成几种类别和功能。聚合酶作为逆转录酶(RT)发挥作用,以从前基因组RNA(pgRNA)制备病毒DNA,并且作为DNA依赖性聚合酶发挥作用,以从病毒DNA制备共价封闭的环状DNA(cccDNA)。它们共价附接于负链的5’端。核心蛋白构成病毒衣壳和分泌的E抗原。表面抗原是肝细胞内化配体,并且也是病毒球形和丝状颗粒的主要成分。产生的病毒颗粒是Dane颗粒(感染性病毒粒子)的1000倍以上,并且可充当免疫诱饵。

[0233] 乙型肝炎病毒表面抗原

[0234] 如本文所用,术语“乙型肝炎病毒表面抗原”或“HBsAg”是指由HBV基因组的基因S(例如,ORF S)编码的S结构域蛋白。乙型肝炎病毒颗粒在核心颗粒中携带病毒核酸,该核心颗粒被基因S编码的三种蛋白质包封,即大表面蛋白、中表面蛋白和主要表面蛋白。在这些蛋白质中,主要表面蛋白通常约为226个氨基酸并且包含仅S结构域。

[0235] 感染

[0236] 如本文所用,术语“感染”是指受试者中诸如病毒的微生物的病原体入侵和/或扩增。感染可能是溶原性的,例如,其中病毒DNA在细胞内处于休眠状态。另选地,感染可以是溶解性的,例如,其中病毒活跃增殖并引起被感染细胞的破坏。感染可能会或可能不会导致临床上明显的症状。感染可以保持在局部,或者可以例如通过受试者的血液或淋巴系统扩散。可以通过检测病毒载量、表面抗原(HBsAg)、e抗原(HBeAg)以及本领域已知的用于检测HBV感染的各种其他测定法中的一者或多者来鉴定患有例如HBV感染的个体。用于检测HBV感染的测定法可包括测试血清或血液样品中是否存在HBsAg和/或HBeAg,并且任选地进一步筛选一种或多种病毒抗体(例如,IgM和/或IgG)的存在以补偿其中HBV抗原可能处于不可检测的水平的任何时期。

[0237] HBV感染

[0238] 术语“乙型肝炎病毒感染”或“HBV感染”在本领域中是公知的,是指由乙型肝炎病毒(HBV)引起并影响肝脏的传染病。HBV感染可以是急性或慢性感染。一些受感染的人在初始感染期间无症状,而有些人发生呕吐、皮肤发黄、疲劳、小便黄赤和腹痛的疾病快速发作(“Hepatitis B Fact sheet N°204”.who.int.2014年7月.2014年11月4日检索)。这些症状通常会持续数周并可能导致死亡。症状开始出现可能需要30天至180天。在出生时受感染的人中,90%会发展为慢性乙型肝炎感染,而在五岁之后受感染的人中只有不到10%会发展为慢性乙型肝炎感染(“Hepatitis B FAQs for the Public-Transmission”,U.S.Centers for Disease Control and Prevention(CDC),2011-11-29检索)。大多数慢性疾病患者没有症状;然而,最终可能会发展为肝硬化和肝癌(Chang,2007,Semin Fetal Neonatal Med,12:160-167)。这些并发症导致15%至25%的患有慢性疾病的那些人死亡(“Hepatitis B Fact sheet N°204”.who.int.2014年7月,2014年11月4日检索)。本文中,术语“HBV感染”包括急性乙型肝炎感染和慢性乙型肝炎感染。术语“HBV感染”还包括初始感染的渐进期、有症状期以及HBV感染的渐进慢性期。

[0239] 肝脏炎症

[0240] 如本文所用,术语“肝脏炎症”或“肝炎”是指这样一种身体状况,其中肝脏变得肿胀、功能障碍和/或疼痛,尤其是由于受伤或感染所致,可以由于接触肝毒剂引起。症状可包括黄疸(皮肤或眼睛发黄)、疲劳、虚弱、恶心、呕吐、食欲下降和体重减轻。如果不加以治疗,肝脏炎症可能会进展为纤维化、肝硬化、肝衰竭或肝癌。

[0241] 肝纤维化

[0242] 如本文所用,术语“肝纤维化”或“肝的纤维化”是指由炎症和肝细胞死亡引起的细胞外基质蛋白在肝脏中的过度积累,该细胞外基质蛋白可包括胶原蛋白(I、III和IV)、纤连蛋白、粗纤维调节素(undulin)、弹性蛋白、层粘连蛋白、透明质酸和蛋白聚糖。如果不加以治疗,肝纤维化可能会发展为肝硬化、肝衰竭或肝癌。

[0243] TLR7

[0244] 如本文所用，“TLR7”是指任何起源物种(例如，人、鼠、土拨鼠等)的Toll样受体7。

[0245] TLR7激动剂

[0246] 如本文所用，“TLR7激动剂”是指充当TLR7激动剂的化合物。除非另有说明，否则TLR7激动剂可包括任何药用形式的化合物，包括任何异构体(例如，非对映体或对映体)、盐、溶剂化物、多晶型物等。可以任何合适的方式确定特定化合物的TLR激动作用。例如，用于检测测试化合物的TLR激动作用的测定法描述于例如2002年12月11日提交的美国临时专利申请序列号60/432,650中，并且适用于此类测定法的重组细胞系描述于例如2002年12月11日提交的美国临时专利申请序列号60/432,651中。用于评估TLR7激动剂的另一种测定法是WO2016/091698的实例43中描述的HEK293-Blue-hTLR-7细胞测定法(该测定法在此以引用方式并入)。

[0247] 非对映体

[0248] 如本文所用，术语“非对映体”是指具有两个或更多个手性中心并且其分子并非彼此镜像的立体异构体。非对映体具有不同的物理特性，例如熔点、沸点、光谱特性、活性和反应性。

[0249] 含有一个或若干个手性中心的通式(I)-(V)的化合物可作为外消旋体、非对映体混合物或光学活性单一异构体存在。可以根据已知方法将外消旋体分离成对映体。特别地，可通过结晶分离的非对映体盐是通过与光学活性酸诸如例如D-酒石酸或L-酒石酸、扁桃酸、苹果酸、乳酸或樟脑磺酸反应而从外消旋混合物形成的。

[0250] 药用盐

[0251] 根据本发明的化合物可以以其药用盐的形式存在。

[0252] 术语“药用盐”是指保留游离碱或游离酸的生物效果和特性的那些盐，这些盐在生物学或其他方面不是不合需要的。这些盐用无机酸诸如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸(特别地盐酸)和有机酸诸如乙酸、丙酸、乙醇酸、丙酮酸、草酸、马来酸、丙二酸、琥珀酸、富马酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、甲磺酸、乙磺酸、对甲苯磺酸、水杨酸、N-乙酰基半胱氨酸形成。

[0253] 另选地，可通过无机碱或有机碱与游离酸的加成来制备这些盐。衍生自无机碱的盐包括但不限于钠盐、钾盐、锂盐、铵盐、钙盐、镁盐。衍生自有机碱的盐包括但不限于以下物质的盐：伯胺、仲胺和叔胺、取代胺(包括天然存在的取代胺)、环胺和碱性离子交换树脂，诸如异丙胺、三甲胺、二乙胺、三乙胺、三丙胺、乙醇胺、赖氨酸、精氨酸、N-乙基哌啶、哌啶、聚胺树脂。式(I)化合物也可以两性离子的形式存在。式(I)化合物的特别优选的药用的盐是盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸和甲磺酸的盐。

[0254] 为了获得改善的化合物的物理和化学稳定性、吸湿性、流动性和溶解性而将药物化合物化学修饰成盐是药物化学家众所周知的技术。例如，Bastin在《有机工艺研究与发展》(Organic Process Research&Development)2000年第4期，第427-435页或Ansel在以下文章中对此进行了描述：《药物剂型和药物递送系统(第六版)》(Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,6th ed.(1995))第196和1456-1457页。例如，本文提供的化合物的药学上可接受的盐可以是钠盐。

[0255] 药物组合

[0256] 如本文所用，药物组合应理解为用于治疗疾病的至少两种不同的活性化合物或前

药(医疗化合物或药物)的组合。药物组合可涉及:以物理方式、以化学方式或以其他方式组合(例如,在同一小瓶中)的化合物;包装在一起的化合物(例如,作为同一包装(组分试剂盒)中用于同时施用或单独施用的两个单独的物体);或单独提供但旨在被一起使用的化合物(例如,该组合在化合物标签或包装插页上有明确说明)。在一个实施方案中,药物组合由配制用于口服施用的医疗化合物和配制用于皮下注射的医疗化合物组成。

[0257] 大约

[0258] 如本文所用,术语"大约"或"约",如应用于一个或多个感兴趣的值,是指类似于所陈述的参考值的值。在某些实施方案中,术语"大约"或"约"是指在任一方向上(大于或小于)落入所陈述的参考值的25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更小的范围内的值范围,除非另有说明或从上下文中可以明显看出(除非这样的数字将超过可能值的100%)。

[0259] 施用

[0260] 如本文所用,术语"施用(administering)"或"施用(administration)"是指以药理学上有用的方式(例如,治疗受试者的病症)向受试者提供物质(例如,药物组合或寡核苷酸)。

[0261] 脱唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)

[0262] 如本文所用,术语"脱唾液酸糖蛋白受体"或"ASGPR"是指由主要的48kDa(ASGPR-1)和次要的40kDa亚基(ASGPR-2)形成的二分(bipartite)C型凝集素。ASGPR主要在肝细胞的血窦面(sinusoidal surface)上表达,并在结合、内化和随后清除包含末端半乳糖或N-乙酰半乳糖胺残基(脱唾液酸糖蛋白)的循环糖蛋白中具有主要作用。

[0263] 前药

[0264] 如本文所用,术语"前药"是指化合物的一种形式或衍生物,其在体内代谢(例如,在施用之后由受试者通过生物体液或酶代谢)成该化合物的药理学活性形式以产生期望的药理作用。前药描述于例如Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action,Richard B.Silverman,Academic Press,San Diego,2004,第8章Prodrugs and Drug Delivery Systems,第497-558页中。

[0265] 受试者

[0266] 如本文所用,术语"受试者"是指任何哺乳动物,包括小鼠、兔子和人类。在一个实施方案中,受试者是人或非人灵长类动物。术语"个体"或"患者"可以与"受试者"互换使用。

[0267] 治疗

[0268] 本文使用的术语"治疗(treatment)"、"治疗(treating)"、"治疗(treats)"等通常是指获得期望的药理作用和/或生理作用。这种作用就部分或完全治愈疾病和/或归因于该疾病的副作用而言是治疗性的。通过向受试者施用治疗剂(例如,药物组合或寡核苷酸)来提供该作用,以用于改善受试者相对于现有病症(例如,现有HBV感染)的健康和/或康乐或者预防病症发生或降低病症发生的可能性(例如,预防肝纤维化、肝炎、肝癌或与HBV感染相关联的其他病症)的目的。如本文所用,术语"治疗"涵盖对受试者HBV感染的任何治疗并且包括:(a)抑制疾病,即阻止其发展,如抑制HBsAg和/或HBeAg的增加;(b)减轻(即缓解)疾病,即引起疾病消退,如抑制HBsAg和/或HBeAg产生。因此,减轻和/或抑制HBV感染的化合物或化合物组合是治疗HBV发明的化合物或化合物组合。优选地,如本文所用的术语"治疗"涉

及已经表现出的疾患的医疗干预,如已经确定和表现出的HBV感染特别是慢性HBV感染的治疗。

[0269] 在一些实施方案中,治疗涉及降低受试者经历的病症(例如,HBV感染或相关病症)的至少一种体征、症状或贡献因素的频率或严重性。在HBV感染期间,受试者可能表现出诸如皮肤和眼睛发黄(黄疸)、小便黄赤、极度疲劳、恶心、呕吐和腹痛等症状。因此,在一些实施方案中,本文提供的治疗(例如药物组合)可引起一种或多种此类症状的频率或严重性降低。然而,HBV感染可发展为一种或多种肝脏病症,诸如肝硬化、肝纤维化、肝脏炎症或肝癌。因此,在一些实施方案中,本文提供的治疗(例如药物组合)可引起一种或多种此类病症的频率或严重性降低或者预防或减轻一种或多种此类病症。

[0270] 治疗有效量

[0271] 术语“治疗有效量”表示本发明的化合物药物组合的量,当将其施用于受试者时,(i)治疗或预防特定疾病、病症或疾患,(ii)减弱、减轻或消除特定疾病、病症或疾患的一种或多种症状,或(iii)预防或延缓本文所述的特定疾病、病症或疾患的一种或多种症状的发作。治疗有效量取决于化合物,所治疗的疾病状态,所治疗疾病的严重程度,受试者的年龄和相对健康状况,施用途径和形式,主治医学或兽医的判断和其他因素。

[0272] 赋形剂

[0273] 如本文所用,术语“赋形剂”是指可包含在一种或多种组合物中的非治疗剂,该一种或多种组合物包含作为药物组合的一部分的药物,例如以提供或有助于期望的稠度或稳定作用。

具体实施方式

[0274] 本发明涉及一种药物组合,该药物组合包含各自在药用载体中的两类化合物:i)治疗性寡核苷酸,和ii)TLR7激动剂。该药物组合用于治疗乙型肝炎病毒感染,特别是治疗慢性HBV患者。

[0275] 下面将分别描述组合中的每一类化合物,然而应当理解,来自每一类的至少一种化合物存在于药物组合中。化合物可同时或单独施用。靶向HBV的治疗性寡核苷酸类别中的化合物可肠胃外施用(诸如静脉内、皮下或肌肉内)。TLR7激动剂可肠内施用(诸如口服或通过胃肠道)。

[0276] 在第一实施方案中,靶向HBV的治疗性寡核苷酸为RNAi寡核苷酸,优选为用于减少HBsAg mRNA的表达的RNAi寡核苷酸。在第二实施方案中,靶向HBV的治疗性寡核苷酸为反义寡核苷酸,优选为靶向HBV的GalNAc缀合的反义寡核苷酸。

[0277] 1.本发明的RNAi寡核苷酸

[0278] 在一些实施方案中,本发明的药物组合中的第一药物是可用于实现治疗益处的基于寡核苷酸的HBV表面抗原表达抑制剂。通过检查HBV表面抗原mRNA和测试不同的寡核苷酸,已开发出有效的寡核苷酸用于减少HBV表面抗原(HBsAg)的表达以治疗HBV感染。在一些实施方案中,本文提供的寡核苷酸被设计为靶向覆盖>95%的已知HBV基因组在所有已知基因型上的HBsAg mRNA序列。在一些实施方案中,此类寡核苷酸引起肝脏中HBV前基因组RNA(pgRNA)和HBsAg mRNA降低超过90%。在一些实施方案中,在单个剂量或治疗方案之后,HBsAg表达的减少持续延长的时间段。

[0279] 因此，在一些实施方案中，为了在细胞中靶向转录物并抑制其表达，将本文提供的寡核苷酸设计成具有与HBsAg mRNA互补的区域。互补区通常具有合适的长度和碱基含量，使得寡核苷酸(或其链)能够与HBsAg mRNA退火，以用于抑制其表达的目的。在一些实施方案中，互补区的长度为至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个或至少20个核苷酸。在一些实施方案中，本文提供的寡核苷酸具有与HBsAg mRNA互补的区域，其长度为在12个至30个(例如，12个至30个、12个至22个、15个至25个、17个至21个、18个至27个、19个至27个、或15个至30个)核苷酸的范围内。在一些实施方案中，本文提供的寡核苷酸具有与HBsAg mRNA互补的区域，其长度为为12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个或30个核苷酸。

[0280] 在一些实施方案中，本文提供的寡核苷酸被设计成靶向编码HBsAg的mRNA序列。例如，在一些实施方案中，提供了具有反义链的寡核苷酸，该反义链具有与如下所示的序列互补的区域：ACAANAAUCCUCACAAUA(SEQ ID NO:33)，其中N是指任何核苷酸(A、G、T或C)。在一些实施方案中，寡核苷酸还包含与反义链形成双链体区的正义链。在一些实施方案中，正义链具有与如下所示的序列互补的区域：UUNUUGUGAGGAUUN(SEQ ID NO:34)。在一些实施方案中，正义链包含与如下所示的序列(示出为5’至3’)互补的区域：UUAUUGUGAGGAUUNUUGUC(SEQ ID NO:35)。

[0281] 在一些实施方案中，反义链包含如下所示的序列或由如下所示的序列组成：UUAUUGUGAGGAUUNUUGUCGG(SEQ ID NO:36)。在一些实施方案中，反义链包含如下所示的序列或由如下所示的序列组成：UUAUUGUGAGGAUUCUUGUCGG(SEQ ID NO:37)。在一些实施方案中，反义链包含如下所示的序列或由如下所示的序列组成：UUAUUGUGAGGAUUUUUGUCGG(SEQ ID NO:38)。在一些实施方案中，正义链包含如下所示的序列或由如下所示的序列组成：ACAANAAUCCUCACAAUAA(SEQ ID NO:39)。在一些实施方案中，正义链包含如下所示的序列或由如下所示的序列组成：GACAANAAUCCUCACAAUAAGCAGCCGAAAGGCUGC(SEQ ID NO:40)。在一些实施方案中，正义链包含如下所示的序列或由如下所示的序列组成：GACAAAAAUCCUCACAAUAAGCAGCCGAAAGGCUGC(SEQ ID NO:41)。在一些实施方案中，正义链包含如下所示的序列或由如下所示的序列组成：GACAAGAAUCCUCACAAUAAGCAGCCGAAAGGCUGC(SEQ ID NO:42)。

[0282] 在一些实施方案中，用于减少HBsAg mRNA的表达的寡核苷酸包含与反义链形成双链体区的正义链，其中正义链包含如SEQ ID NO:39-42中任一项所示的序列，并且反义链包含如SEQ ID NO:36-38中任一项所示的序列。在一些实施方案中，正义链包含2’-氟和2’-O-甲基修饰的核苷酸以及至少一个硫代磷酸酯核苷酸间键。在一些实施方案中，正义链缀合至N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)部分。在一些实施方案中，反义链包含2’-氟和2’-O-甲基修饰的核苷酸以及至少一个硫代磷酸酯核苷酸间键。在一些实施方案中，反义链的5’-核苷酸的糖的4’-碳包含磷酸类似物。在一些实施方案中，反义链和正义链中的每一者包含2’-氟和2’-O-甲基修饰的核苷酸以及至少一个硫代磷酸酯核苷酸间键，其中反义链的5’-核苷酸的糖的4’-碳包含磷酸类似物，并且正义链缀合至N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)部分。

[0283] 在一些实施方案中，包含如SEQ ID NO:40-42中任一项所示的序列的正义链包含在第3位、第8位至第10位、第12位、第13位和第17位处的2’-氟修饰的核苷酸。在一些实施方案中，正义链包含在第1位、第2位、第4位至第7位、第11位、第14位至第16位、第18位至第26

位以及第31位至第36位处的2'-O-甲基修饰的核苷酸。在一些实施方案中,正义链包含一个硫代磷酸酯核苷酸间键。在一些实施方案中,正义链包含在第1位和第2位处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键。在一些实施方案中,正义链缀合至N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)部分。

[0284] 在一些实施方案中,包含如SEQ ID NO:36-38中任一项所示的序列的反义链包含在第2位、第3位、第5位、第7位、第8位、第10位、第12位、第14位、第16位和第19位处的2'-氟修饰的核苷酸。在一些实施方案中,反义链包含在第1位、第4位、第6位、第9位、第11位、第13位、第15位、第17位、第18位以及第20位至第22位处的2'-O-甲基修饰的核苷酸。在一些实施方案中,反义链包含三个硫代磷酸酯核苷酸间键。在一些实施方案中,反义链包含在第1位和第2位处的核苷酸之间、在第2位和第3位处的核苷酸之间、在第3位和第4位处的核苷酸之间、在第20位和第21位处的核苷酸之间以及在第21位和第22位处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键。在一些实施方案中,反义链的5'-核苷酸的糖的4'-碳包含磷酸类似物。

[0285] I.用于靶向HBsAg mRNA的双链寡核苷酸

[0286] 存在多种可用于本公开的药物组合中靶向HBsAg mRNA表达的寡核苷酸结构,包括RNAi、反义、miRNA等。本文或其他地方描述的任何结构都可用作框架以引入或靶向本文所述的序列。用于靶向HBV抗原表达(例如,经由RNAi途径)的双链寡核苷酸通常具有彼此形成双链体的正义链和反义链。在一些实施方案中,正义链和反义链不是共价联接的。然而,在一些实施方案中,正义链和反义链是共价联接的。

[0287] 在本发明的一些实施方案中,用于减少HBsAg mRNA表达的表达的双链寡核苷酸参与RNA干扰(RNAi)。例如,已经开发出RNAi寡核苷酸,其中每条链具有19个至25个核苷酸的大小,其中1个至5个核苷酸具有至少一个3'突出端(参见,例如,美国专利号8,372,968)。还已经开发出了更长的寡核苷酸,其被Dicer加工以生成活性RNAi产物(参见,例如,美国专利号8,883,996)。进一步的工作产生了延伸的双链寡核苷酸,其中至少一条链的至少一个端延伸超出双链体靶向区,包括其中一条链包括热力学稳定的四环结构的结构(参见,例如,美国专利号8,513,207和8,927,705,以及WO2010033225,其关于这些寡核苷酸的公开内容通过引用并入本文)。此类结构可包括单链延伸(在分子的一侧或两侧)以及双链延伸。

[0288] 在一些实施方案中,本文提供的寡核苷酸可被Dicer酶裂解。此类寡核苷酸在正义链的3'端可具有突出端(例如,长度为1个、2个或3个核苷酸)。此类寡核苷酸(例如,siRNA)可包含与靶RNA反义的21个核苷酸的引导链和互补的过客链,其中两条链退火以形成19-bp的双链体和在3'端中的任一者或两者上的2个核苷酸突出端。还可使用更长的寡核苷酸设计,包括具有23个核苷酸的引导链和21个核苷酸的过客链的寡核苷酸,其中分子的右侧有平端(过客链的3'端/引导链的5'端),并且分子的左侧有两个核苷酸的3'引导链突出端(过客链的5'端/引导链的3'端)。在此类分子中,存在21个碱基对的双链体区。参见,例如,US9012138、US9012621和US9193753,其各自的相关公开内容并入本文。

[0289] 在一些实施方案中,本文公开的寡核苷酸可包含长度都在17个至26个(例如,17个至26个、20个至25个、19个至21个或21个至23个)核苷酸范围内的正义链和反义链。在一些实施方案中,正义链和反义链具有相等的长度。在一些实施方案中,对于具有长度均在21个至23个核苷酸范围内的正义和反义链的寡核苷酸,在正义链、反义链或者正义链和反义链两者上的3'突出端的长度为1个或2个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸具有23个核苷

酸的引导链和21个核苷酸的过客链，其中分子的右侧有平端(过客链的3’端/引导链的5’端)，并且分子的左侧有两个核苷酸的3’引导链突出端(过客链的5’端/引导链的3’端)。在此类分子中，存在21个碱基对的双链体区。在一些实施方案中，寡核苷酸包含25个核苷酸的正义链和27个核苷酸的反义链，当由dicer酶作用时，产生被引入到成熟RISC中的反义链。

[0290] 用于与本文公开的组合物和方法一起使用的其他寡核苷酸设计包括：16-mer siRNA(参见，例如，Nucleic Acids in Chemistry and Biology.Blackburn(编辑)，Royal Society of Chemistry,2006)、shRNA(例如，具有19bp或更短的茎；参见，例如，Moore等人Methods Mol.Biol.2010;629:141-158)、平端siRNAs(例如，长度为19bps；参见：例如，Kraynack和Baker,RNA第12卷，第163-176页(2006))、不对称siRNA(aiRNA；参见，例如，Sun等人,Nat.Biotechnol.26,1379-1382(2008))、不对称较短双链体siRNA(参见，例如，Chang等人,Mol Ther.2009年4月;17(4):725-32)、叉形siRNA(参见，例如，Hohjoh,FEBS Letters,第557卷，第1-3期；2004年1月，第193-198页)、单链siRNA(Elsner;Nature Biotechnology 30,1063(2012))、哑铃形环状siRNA(参见，例如，Abe等人J Am Chem Soc 129:15108-15109(2007))和小的内部分段干扰RNA(sisiRNA；参见，例如，Bramsen等人，Nucleic Acids Res.2007年9月;35(17):5886-5897)。每个前述参考文献的全部相关公开内容通过引用并入本文。可在一些实施方案中在药物组合中使用以减少或抑制HBsAg的表达的寡核苷酸结构的进一步的非限制性实例是微小RNA(miRNA)、短发夹RNA(shRNA)和短siRNA(参见，例如，Hamilton等人,Embo J.,2002,21(17):4671-4679；另请参见美国申请号20090099115)。

[0291] a.反义链

[0292] 在一些实施方案中，寡核苷酸的反义链可被称为“引导链”。例如，如果反义链可参与RNA诱导的沉默复合物(RISC)并与Argonaut蛋白结合，或者参与或结合一种或多种类似因子，并直接沉默靶基因，则其可被称为引导链。在一些实施方案中，与引导链互补的正义链可被称为“过客链”。

[0293] 在一些实施方案中，本文提供的寡核苷酸包含长度为至多50个核苷酸(例如，长度为至多30个、至多27个、至多25个、至多21个或至多19个核苷酸)的反义链。在一些实施方案中，本文提供的寡核苷酸包含长度为至少12个核苷酸(例如，长度为至少12个、至少15个、至少19个、至少21个、至少25个或至少27个核苷酸)的反义链。在一些实施方案中，本文公开的寡核苷酸的反义链的长度在12个至50个或12个至30个(例如，12个至30个、11个至27个、11个至25个、15个至21个、15个至27个、17个至21个、17个至25个、19个至27个或19个至30个)核苷酸的范围内。在一些实施方案中，本文公开的寡核苷酸中的任一个寡核苷酸的反义链的长度为12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个或50个核苷酸。

[0294] 在一些实施方案中，反义链包含与如下所示的序列(示出为5’至3’)互补的区域：AATCCTCACA(SEQ ID NO:43)。在一些实施方案中，反义链包含如下所示的序列(示出为5’至3’)：UGUGAGGAUU(SEQ ID NO:44)。在一些实施方案中，反义链包含如下所示的序列(示出为5’至3’)：TGTGAGGATT(SEQ ID NO:45)。

[0295] 在一些实施方案中，用于减少HBsAg mRNA的表达的寡核苷酸可包含具有与如SEQ

ID NO:43所示的序列互补的区域的反义链以及在其3’末端的一个或两个非互补核苷酸。在一些实施方案中，反义链包含SEQ ID NO:36-38中任一者所示的核苷酸序列。

[0296] 在一些实施方案中，用于减少HBsAg mRNA的表达的寡核苷酸可包含具有与如SEQ ID NO:43所示的序列互补的区域的反义链，其中该反义链不具有以下任一者所示的序列(示出为5’至3’)：TATTGTGAGGATTCTTGTCA(SEQ ID NO:46)；CGGTATTGTGAGGATTCTTG(SEQ ID NO:47)；

[0297] TGTGAGGATTCTTGTCAACA(SEQ ID NO:48)；

[0298] UAUUGUGAGGAUUUUUGUCAA(SEQ ID NO:49)；

[0299] UGCGGUAUUGUGAGGAUUCTT(SEQ ID NO:50)；

[0300] ACAGCATTGTGAGGATTCTTGTC(SEQ ID NO:51)；

[0301] UAUUGUGAGGAUUUUUGUCAACA(SEQ ID NO:52)；

[0302] AUUGUGAGGAUUUUUGUCAACAA(SEQ ID NO:53)；和

[0303] UUGUGAGGAUUUUUGUCAACAAG(SEQ ID NO:54)。在一些实施方案中，反义链与SEQ ID NO:36、37或38所示的核苷酸序列相差不超过三个核苷酸。

[0304] b.正义链

[0305] 在一些实施方案中，双链寡核苷酸可具有长度为至多40个核苷酸(例如，长度为至多40个、至多35个、至多30个、至多27个、至多25个、至多21个、至多19个、至多17个或至多12个核苷酸)的正义链。在一些实施方案中，寡核苷酸可具有长度为至少12个核苷酸(例如，长度为至少12个、至少15个、至少19个、至少21个、至少25个、至少27个、至少30个、至少35个或至少38个核苷酸)的正义链。在一些实施方案中，寡核苷酸可具有长度在12个至50个(例如，12个至40个、12个至36个、12个至32个、12个至28个、15个至40个、15个至36个、15个至32个、15个至28个、17个至21个、17个至25个、19个至27个、19个至30个、20个至40个、22个至40个、25个至40个或32个至40个)核苷酸范围内的正义链。在一些实施方案中，寡核苷酸可具有长度为12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个或40个核苷酸的正义链。在一些实施方案中，寡核苷酸的正义链长于27个核苷酸(例如，28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个或40个核苷酸)。在一些实施方案中，寡核苷酸的正义链长于25个核苷酸(例如，26个、27个、28个、29个或30个核苷酸)。

[0306] 在一些实施方案中，正义链在其3’端包含茎环。在一些实施方案中，正义链在其5’端包含茎环。在一些实施方案中，包含茎环的链的长度在2个至66个核苷酸(例如，2个至66个、10个至52个、14个至40个、2个至30个、4个至26个、8个至22个、12个至18个、10个至22个、14个至26个或14个至30个核苷酸长)的范围内。在一些实施方案中，包含茎环的链的长度为8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个或30个核苷酸。在一些实施方案中，茎包含长度为1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个或14个核苷酸的双链体。在一些实施方案中，茎环为分子提供了更好的免于降解(例如，酶促降解)的保护，并促进了用于递送至靶细胞的靶向特征。例如，在一些实施方案中，环提供了添加的核苷酸，可在该添加的核苷酸上进行修饰而基本上不影响寡核苷酸的基因表达抑制活性。在某些实施方案中，本文提供了一种寡核苷酸，其中正义链包含(例如，在其3’端)如下所示的茎环：S_1-L-S_2，

其中S_1与S_2互补，并且其中L在S_1和S_2之间形成长度为至多10个核苷酸的环(例如，长度为1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个核苷酸)。

[0307] 在一些实施方案中，茎环的环(L)为四环(例如，在带切口的四环结构内)。四环可包含核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸、修饰的核苷酸及其组合。通常，四环具有4个至5个核苷酸。

[0308] c.双链体长度

[0309] 在一些实施方案中，在正义链与反义链之间形成的双链体的长度为至少12个(例如，至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个、至少20个或至少21个)核苷酸。在一些实施方案中，在正义链与反义链之间形成的双链体的长度在12个至30个核苷酸的范围内(例如，长度为12个至30个、12个至27个、12个至22个、15个至25个、18个至30个、18个至22个、18个至25个、18个至27个、18个至30个、19个至30个或21个至30个核苷酸)。在一些实施方案中，在正义链与反义链之间形成的双链体的长度为12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个或30个核苷酸。在一些实施方案中，在正义链与反义链之间形成的双链体不跨越正义链和/或反义链的整个长度。在一些实施方案中，正义链与反义链之间的双链体跨越正义链或反义链的整个长度。在某些实施方案中，正义链与反义链之间的双链体跨越正义链和反义链两者的整个长度。

[0310] d.寡核苷酸端

[0311] 在一些实施方案中，寡核苷酸包含正义链和反义链，使得在正义链或反义链或者正义链和反义链两者上存在3’突出端。在一些实施方案中，本文提供的寡核苷酸具有一个5’端，其与其他5’端相比在热力学上较不稳定。在一些实施方案中，提供了不对称寡核苷酸，其包含在正义链的3’端的平端和在反义链的3’端的突出端。在一些实施方案中，反义链上的3’突出端的长度为1个至8个核苷酸(例如，长度为1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个或8个核苷酸)。

[0312] 通常，RNAi的寡核苷酸在反义(引导)链的3’端具有两个核苷酸的突出端。然而，其他突出端也是可能的。在一些实施方案中，突出端是3’突出端，其包含一个至六个核苷酸之间的长度，任选地一个至五个、一个至四个、一个至三个、一个至两个、两个至六个、两个至五个、两个至四个、两个至三个、三个至六个、三个至五个、三个至四个、四个至六个、四个至五个、五个至六个核苷酸，或者一个、两个、三个、四个、五个或六个核苷酸。然而，在一些实施方案中，突出端是5’突出端，其包含一个至六个核苷酸之间的长度，任选地一个至五个、一个至四个、一个至三个、一个至两个、两个至六个、两个至五个、两个至四个、两个至三个、三个至六个、三个至五个、三个至四个、四个至六个、四个至五个、五个至六个核苷酸，或者一个、两个、三个、四个、五个或六个核苷酸。

[0313] 在一些实施方案中，正义链和/或反义链的3’端或5’端的一个或多个(例如，2个、3个、4个)末端核苷酸被修饰。例如，在一些实施方案中，反义链的3’端的一个或两个末端核苷酸被修饰。在一些实施方案中，反义链的3’端的最后一个核苷酸被修饰，例如，包含2’-修饰，例如，2’-O-甲氧基乙基。在一些实施方案中，反义链的3’端的最后一个或两个末端核苷酸与靶标互补。在一些实施方案中，反义链的3’端的最后一个或两个核苷酸与靶标不互补。

[0314] 在一些实施方案中，提供了双链寡核苷酸，其在正义链的3’端具有带切口的四环结构，并且在其反义链的3’端具有两个末端突出核苷酸。在一些实施方案中，该两个末端突

出核苷酸为GG。通常，反义链的该两个末端GG核苷酸中的一者或两者与靶标互补或不互补。

[0315] 在一些实施方案中，正义链或反义链的5’端和/或3’端具有反向帽核苷酸。

[0316] 在一些实施方案中，在正义链和/或反义链的3’端或5’端的末端核苷酸之间提供了一个或多个(例如，2个、3个、4个、5个、6个)修饰的核苷酸间键。在一些实施方案中，在正义链和/或反义链的3’端或5’端的突出核苷酸之间提供了修饰的核苷酸间键。

[0317] e.错配

[0318] 在一些实施方案中，寡核苷酸可在正义链与反义链之间具有一个或多个(例如，1个、2个、3个、4个、5个)错配。如果正义链与反义链之间存在多于一个错配，则它们可以连续定位(例如，在一行中有2个、3个或更多个)，或者散布在整个互补区中。在一些实施方案中，正义链的3’末端含有一个或多个错配。在一个实施方案中，在正义链的3’末端引入了两个错配。在一些实施方案中，寡核苷酸正义链的3’端的区段的碱基错配或去稳定化可能通过Dicer加工促进了RNAi中合成双链体的效力。

[0319] 在一些实施方案中，反义链可具有与HBsAg转录物(其与对应的转录物序列相比包含一个或多个错配)互补的区域。寡核苷酸上的互补区可具有至多1个、至多2个、至多3个、至多4个、至多5个等错配，前提条件是其保持在适当的杂交条件下与转录物形成互补碱基对的能力。另选地，寡核苷酸的互补区可具有不超过1个、不超过2个、不超过3个、不超过4个或不超过5个错配，前提条件是其保持在适当的杂交条件下与HBsAg mRNA形成互补碱基对的能力。在一些实施方案中，如果在互补区中存在多于一个错配，则它们可连续定位(例如，在一行中有2个、3个、4个或更多个)，或者散布在整个互补区中，前提条件是寡核苷酸保持在适当的杂交条件下与HBsAg mRNA形成互补碱基对的能力。

[0320] II.单链寡核苷酸

[0321] 在一些实施方案中，如本文所述用于减少HBsAg表达的RNAi寡核苷酸为与HBsAg mRNA互补的单链寡核苷酸。此类结构可包括但不限于单链RNAi寡核苷酸。最近的努力已经证明了单链RNAi寡核苷酸的活性(参见，例如，Matsui等人(2016年5月)，Molecular Therapy，第24(5)卷，946-955)。

[0322] 虽然这种单链RNAi寡核苷酸在技术上可被认为是反义寡核苷酸，但它仍然可通过RNA干扰机制发挥作用，并将具有本文所述的RNAi寡核苷酸的特征。

[0323] 2.本发明的特异性RNAi寡核苷酸

[0324] 为便于提及并避免不必要的重复，本文所述的本发明的一些RNAi寡核苷酸的定义也通过以下“RNAi ID NO”来提及。

[0325] 在一个实施方案中，本发明的药物组合中的RNAi寡核苷酸为靶向HBV的寡核苷酸。该RNAi寡核苷酸在本文中也称为RNAi ID NO:1。

[0326] 在一个实施方案中，本发明的药物组合中的RNAi寡核苷酸为靶向HBsAg mRNA的寡核苷酸。该RNAi寡核苷酸在本文中也称为RNAi ID NO:2。

[0327] 在一个实施方案中，本发明的药物组合中的RNAi寡核苷酸为减少HBsAg mRNA的表达的寡核苷酸。该RNAi寡核苷酸在本文中也称为RNAi ID NO:3。

[0328] 在一个实施方案中，本发明的药物组合中的RNAi寡核苷酸为包含长度为19个至30个核苷酸的反义链的寡核苷酸，其中该反义链包含与HBsAg mRNA的如ACAANAAUCCUCACAAUA所示的序列互补的区(SEQ ID NO:33)。该RNAi寡核苷酸在本文中也称为RNAi ID NO:4。

[0329] 在一个实施方案中，本发明的药物组合中的RNAi寡核苷酸为用于减少HBsAg mRNA的表达的寡核苷酸，该寡核苷酸包含长度为19个至30个核苷酸的反义链，其中该反义链包含与HBsAg mRNA的如ACAANAAUCCUCACAAUA所示的序列互补的区(SEQ ID NO:33)。该RNAi寡核苷酸在本文中也称为RNAi ID NO:5。

[0330] 在一个实施方案中，本发明的药物组合中的RNAi寡核苷酸为用于减少乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)mRNA的表达的寡核苷酸，该寡核苷酸包含与反义链形成双链体区的正义链，其中：

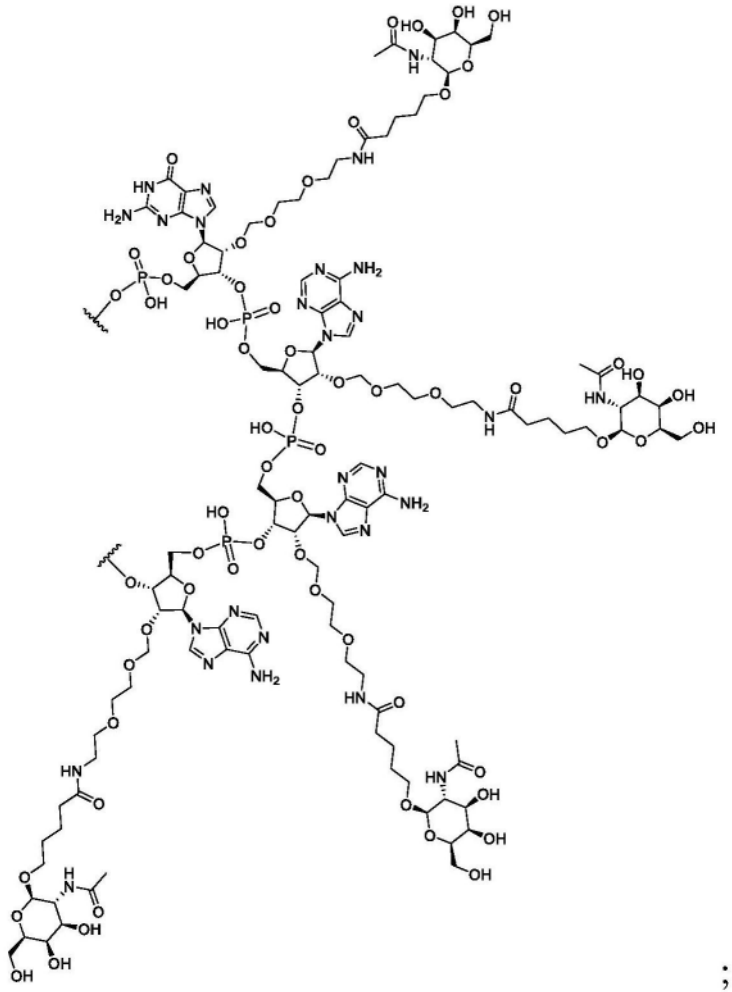
[0331] 该正义链由如GACAAAAAUCCUCACAAUAAGCAGCCGAAAGGCUGC(SEQ ID NO:41)所示的序列组成，并且包含：在第3位、第8位至第10位、第12位、第13位和第17位处的2'-氟修饰的核苷酸；在第1位、第2位、第4位至第7位、第11位、第14位至第16位、第18位至第26位和第31位至第36位处的2'-O-甲基修饰的核苷酸；以及在第1位和第2位处的核苷酸之间的硫代磷酸酯键，其中该正义链上的-GAAA-序列的核苷酸中的每个核苷酸缀合至单价GalNac部分；并且

[0332] 该反义链由如UUAUUGUGAGGAUUUUUGUCGG(SEQ ID NO:38)所示的序列组成，并且包含在第2位、第3位、第5位、第7位、第8位、第10位、第12位、第14位、第16位和第19位处的2'-氟修饰的核苷酸；在第1位、第4位、第6位、第9位、第11位、第13位、第15位、第17位、第18位和第20位至第22位处的2'-O-甲基修饰的核苷酸；以及在第1位和第2位处的核苷酸之间、在第2位和第3位处的核苷酸之间、在第3位和第4位处的核苷酸之间、在第20位和第21位处的核苷酸之间以及在第21位和第22位处的核苷酸之间的硫代磷酸酯键，

[0333] 其中该反义链的5'-核苷酸的糖的4'-碳包含甲氧基膦酸酯(MOP)。该RNAi寡核苷酸在本文中也称为RNAi ID NO:6。

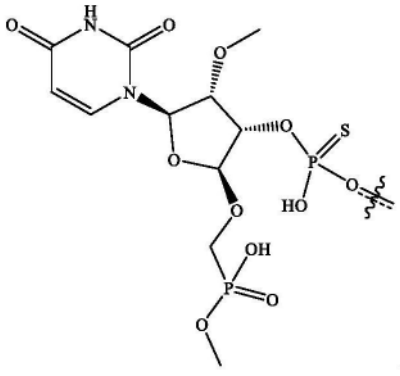
[0334] 在一个实施方案中，本发明的药物组合中的RNAi寡核苷酸为包含与反义链形成双链体区的正义链的寡核苷酸，其中：

[0335] 所述正义链包含如GACAAAAAUCCUCACAAUAAGCAGCCGAAAGGCUGC(SEQ ID NO:41)所示的序列，并且包含：在第3位、第8位至第10位、第12位、第13位和第17位处的2'-氟修饰的核苷酸；在第1位、第2位、第4位至第7位、第11位、第14位至第16位、第18位至第26位和第31位至第36位处的2'-O-甲基修饰的核苷酸；以及在第1位和第2位处的核苷酸之间的一个硫代磷酸酯核苷酸间键，其中所述正义链上的所述-GAAA-序列的所述核苷酸中的每个核苷酸缀合至单价GalNac部分，其中所述-GAAA-序列包含以下结构：

[0336]  并且

;

[0337] 该反义链包含如UUAUUGUGAGGAUUUUUGUCGG(SEQ ID NO:38)所示的序列,并且包含:在第2位、第3位、第5位、第7位、第8位、第10位、第12位、第14位、第16位和第19位处的2'-氟修饰的核苷酸;在第1位、第4位、第6位、第9位、第11位、第13位、第15位、第17位、第18位和第20位至第22位处的2'-O-甲基修饰的核苷酸;以及核苷酸1与核苷酸2之间、核苷酸2与核苷酸3之间、核苷酸3与核苷酸4之间、核苷酸20与核苷酸21之间以及核苷酸21与核苷酸22之间的五个硫代磷酸酯核苷酸间键,其中该反义链的5'-核苷酸的糖的4'-碳具有以下结构:

[0338] 

。

[0339] 该RNAi寡核苷酸在本文中也称为RNAi ID NO:7。在一个实施方案中,RNAi ID NO:7为用于减少HBsAg mRNA的表达的寡核苷酸。在一个实施方案中,RNAi ID NO:7的正义链或反义链或者反义链和正义链两者由RNAi ID NO:7中这些链的上述相应序列组成。在一个实施方案中,在RNAi ID NO:7中,SEQ ID NO:41为5'-GACAAAAAUCCUCACAAUAAGCAGCCGAAAGGC

UGC-3’和/或SEQ ID NO:38为5’-UUAUUGUGAGGAUUUUUGUCGG-3’。

[0340] 在一个实施方案中，本发明的药物组合中的RNAi寡核苷酸具有图29A所示的结构。该RNAi寡核苷酸在本文中也称为RNAi ID NO:8。

[0341] 在一个实施方案中，本发明的药物组合中的RNAi寡核苷酸为寡核苷酸HBV(s)-219。该RNAi寡核苷酸在本文中也称为RNAi ID NO:9。

[0342] 3.本发明的RNAi剂的寡核苷酸修饰

[0343] 本节中讨论的修饰尤其优选用于在本发明的RNAi寡核苷酸中实施。

[0344] 寡核苷酸可以各种方式修饰，以改善或控制特异性、稳定性、递送、生物利用度、对核酸酶降解的抗性、免疫原性、碱基配对特性、RNA分布和细胞摄取以及与治疗或研究用途相关的其他特征。参见，例如，Bramsen等人，Nucleic Acids Res.，2009，37，2867-2881；Bramsen和Kjems(Frontiers in Genetics，3(2012):1-22)。因此，在一些实施方案中，本公开的治疗性寡核苷酸可包括一个或多个合适的修饰。在一些实施方案中，修饰的核苷酸在其碱基(或核碱基)、糖(例如，核糖、脱氧核糖)或磷酸酯基团中具有修饰。

[0345] 寡核苷酸上的修饰的数量和那些核苷酸修饰的位置可影响寡核苷酸的特性。例如，寡核苷酸可通过将它们缀合至脂质纳米颗粒(LNP)或类似载体或者包裹在LNP或类似载体中而在体内递送。然而，当寡核苷酸不受LNP或类似载体的保护时，其核苷酸中的至少一些核苷酸被修饰可能是有利的。因此，在本文提供的治疗性寡核苷酸中的任何治疗性寡核苷酸的某些实施方案中，寡核苷酸的所有或基本上所有核苷酸均被修饰。在某些实施方案中，多于一半的核苷酸被修饰。在某些实施方案中，少于一半的核苷酸被修饰。通常，在裸递送的情况下，每一种糖都在2’位置被修饰。这些修饰可以为可逆的或不可逆的。在一些实施方案中，本文公开的寡核苷酸具有足以引致期望特征(例如，防止酶促降解，在体内施用后靶向期望细胞的能力，和/或热力学稳定性)的数量和类型的修饰的核苷酸。

[0346] I.糖修饰

[0347] 在一些实施方案中，修饰的糖(在本文中也称为糖类似物)包括修饰的脱氧核糖或核糖部分，例如，其中一个或多个修饰发生在糖的2’、3’、4’和/或5’碳位置。在一些实施方案中，修饰的糖还可包括非天然的另选碳结构，诸如存在于锁定的核酸(“LNA”)(参见，例如，Koshkin等人(1998)，Tetrahedron 54，3607-3630)、未锁定的核酸(“UNA”)(参见，例如，Snead等人(2013)，Molecular Therapy-Nucleic Acids，2，e103)和桥连的核酸(“BNA”)(参见，例如，Imanishi和Obika(2002)，The Royal Society of Chemistry，Chem.Commun.，1653-1659)中的那些。Koshkin等人、Snead等人以及Imanishi和Obika的文献涉及糖修饰的公开内容通过引用并入本文。

[0348] 在一些实施方案中，糖中的核苷酸修饰包括2’-修饰。2’-修饰可以为2’-氨基乙基、2’-氟、2’-O-甲基、2’-O-甲氧基乙基和2’-脱氧-2’-氟-β-d-阿糖核酸。通常，该修饰为2’-氟、2’-O-甲基或2’-O-甲氧基乙基。在一些实施方案中，糖中的修饰包括糖环的修饰，其可包括糖环的一个或多个碳的修饰。例如，核苷酸的糖的修饰可包括糖的2’-氧与糖的1’-碳或4’-碳联接，或者2’-氧与1’-碳或4’-碳经由乙烯或亚甲基桥联接。在一些实施方案中，修饰的核苷酸具有缺乏2’-碳至3’-碳键的无环糖。在一些实施方案中，修饰的核苷酸例如在糖的4’位置具有巯基。

[0349] 在一些实施方案中，末端3’-端基(例如，3’-羟基)为磷酸酯基团或其他基团，其可

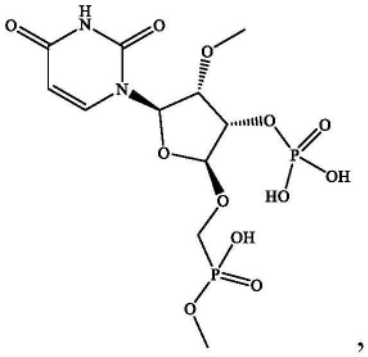
用于例如附接接头、衔接子或标记，或者用于直接连接寡核苷酸与另一核酸。

[0350] II.5’末端磷酸酯

[0351] 在一些实施方案中，寡核苷酸的5’-末端磷酸酯基团增强了与Argonaut 2的相互作用。然而，包含5’-磷酸酯基团的寡核苷酸可能易于经由磷酸酶或其他酶降解，这会限制它们在体内的生物利用度。在一些实施方案中，寡核苷酸包含抵抗这种降解的5’磷酸酯的类似物。在一些实施方案中，磷酸类似物可以为羟基甲基膦酸酯、乙烯基膦酸酯或丙二酰基膦酸酯。在某些实施方案中，寡核苷酸链的5’端附接于模拟天然5’-磷酸酯基团的静电特性和空间特性的化学部分(“磷酸酯模拟物”)(参见，例如，Prakash等人(2015)，Nucleic Acids Res.，Nucleic Acids Res.2015年3月31日;43(6):2993-3011，其与磷酸类似物有关的内容通过引用并入本文)。已经开发了可附接于5’端的许多磷酸酯模拟物(参见，例如，美国专利号8,927,513，其与磷酸类似物有关的内容通过引用并入本文)。已经针对寡核苷酸的5’端开发了其他修饰(参见，例如，WO 2011/133871，其与磷酸类似物有关的内容通过引用并入本文)。在某些实施方案中，羟基附接于寡核苷酸的5’端。

[0352] 在一些实施方案中，寡核苷酸在糖的4’-碳位置处具有磷酸类似物(称为“4’-磷酸类似物”)。参见，例如，2016年9月2日提交的名称为“4′-Phosphate Analogs and Oligonucleotides Comprising the Same”的美国临时申请号62/383,207，以及2016年9月12日提交的名称为“4′-Phosphate Analogs and Oligonucleotides Comprising the Same”的美国临时申请号62/393,401，它们各自涉及磷酸类似物的内容通过引用并入本文。在一些实施方案中，本文提供的寡核苷酸在5’-端核苷酸处包含4’-磷酸类似物。在一些实施方案中，磷酸类似物为氧甲基膦酸酯，其中氧甲基的氧原子结合至糖部分(例如，在其4’-碳处)或其类似物。在其他实施方案中，4’-磷酸类似物为硫代甲基膦酸酯或氨基甲基膦酸酯，其中硫代甲基的硫原子或氨基甲基的氮原子结合至糖部分或其类似物的4’-碳。在某些实施方案中，4’-磷酸类似物为氧甲基膦酸酯。在一些实施方案中，氧甲基膦酸酯由式-O-CH_2-PO(OH)$_2$或-O-CH_2-PO(OR)$_2$表示，其中R独立地选自H、CH_3、烷基、CH_2CH_2CN、$CH_2OCOC(CH_3)_3$、$CH_2OCH_2CH_2Si(CH_3)_3$、或保护基。在某些实施方案中，烷基为CH_2CH_3。更通常地，R独立地选自H、CH_3或CH_2CH_3。

[0353] 在某些实施方案中，附接于寡核苷酸的磷酸类似物为甲氧基膦酸酯(MOP)。在某些实施方案中，附接于寡核苷酸的磷酸类似物为5’单甲基保护的MOP。在一些实施方案中，例如在引导(反义)链的第一位置处可使用包含磷酸类似物的以下尿苷核苷酸：

[0354] 

[0355] 该修饰的核苷酸被称为[甲氧基膦酸酯-4O-mU]或5’-甲氧基膦酸酯-4’氧基-2’-O-甲基尿苷。

[0356] III.修饰的核苷间键

[0357] 在一些实施方案中,磷酸酯修饰或取代可产生包含至少一个(例如,至少1个、至少2个、至少3个或至少5个)修饰的核苷酸间键的寡核苷酸。在一些实施方案中,本文公开的寡核苷酸中的任何一种寡核苷酸包含1个至10个(例如,1个至10个、2个至8个、4个至6个、3个至10个、5个至10个、1个至5个、1个至3个或1个至2个)修饰的核苷酸间键。在一些实施方案中,本文公开的寡核苷酸中的任何一种寡核苷酸包含1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个修饰的核苷酸间键。

[0358] 修饰的核苷酸间键可以为硫代磷酸酯键、硫代磷酸酯键、磷酸三酯键、硫代烷基膦酸酯键、硫代烷基磷酸三酯键、亚磷酰胺键、膦酸酯键或硼酸磷酸酯键。在一些实施方案中,如本文所公开的寡核苷酸中的任何一种寡核苷酸的至少一个修饰的核苷酸间键为硫代磷酸酯键。

[0359] IV.碱基修饰

[0360] 在一些实施方案中,本文提供的寡核苷酸具有一个或多个修饰的核碱基。在一些实施方案中,修饰的核碱基(在本文中也称为碱基类似物)在核苷酸糖部分的1'位置处联接。在某些实施方案中,修饰的核碱基为含氮碱基。在某些实施方案中,修饰的核碱基不包含氮原子。参见例如美国公开专利申请号20080274462。在一些实施方案中,修饰的核苷酸包含通用碱基。然而,在某些实施方案中,修饰的核苷酸不包含核碱基(无碱基)。

[0361] 在一些实施方案中,通用碱基为位于修饰的核苷酸中核苷酸糖部分的1'位置处的杂环部分,或者核苷酸糖部分取代中的等同位置(当存在于双链体中时)可与多于一种类型的碱基相对定位,而基本上不改变双链体的结构。在一些实施方案中,相比于与靶核酸完全互补的参考单链核酸(例如,寡核苷酸),含有通用碱基的单链核酸与靶核酸形成双链体,该双链体相比于与互补核酸形成的双链体具有更低的T_m。然而,在一些实施方案中,相比于其中通用碱基已被碱基替换以生成单个错配的参考单链核酸,含有通用碱基的单链核酸与靶核酸形成双链体,该双链体相比于与包含错配碱基的核酸形成的双链体具有更高的T_m。

[0362] 通用结合核苷酸的非限制性实例包括:肌苷、1-β-D-呋喃核糖基-5-硝基吲哚和/或1-β-D-呋喃核糖基-3-硝基吡咯(Quay等人的美国专利申请公开号20070254362;Van Aerschot等人,An acyclic 5-nitroindazole nucleoside analogue as ambiguous nucleoside,Nucleic Acids Res.1995年11月11日;23(21):4363-70;Loakes等人,3-Nitropyrrole and 5-nitroindole as universal bases in primers for DNA sequencing and PCR,Nucleic Acids Res.1995年7月11日;23(13):2361-6;Loakes和Brown,5-Nitroindole as an universal base analogue,Nucleic Acids Res.1994年10月11日;22(20):4039-43。每个上述文献与碱基修饰相关的公开内容通过引用并入本文)。

[0363] V.可逆修饰

[0364] 尽管可进行某些修饰以保护寡核苷酸在到达靶细胞之前不受体内环境的影响,但是一旦寡核苷酸到达靶细胞的胞质溶胶,它们就可降低寡核苷酸的效力或活性。可进行可逆修饰,使得分子在细胞外保留期望的特性,然后在进入细胞的胞质环境时将其除去。可例如通过细胞内酶的作用或通过细胞内部的化学条件(例如,通过细胞内谷胱甘肽的还原)来除去可逆修饰。

[0365] 在一些实施方案中,可逆地修饰的核苷酸包含谷胱甘肽敏感部分。通常,核酸分子

已用环状二硫化物部分进行化学修饰,以掩盖由核苷酸间二磷酸酯键产生的负电荷,并改善细胞摄取和核酸酶抗性。参见最初转让给Traversa Therapeutics,Inc.(“Traversa”)的美国公开申请号2011/0294869,Solstice Biologics,Ltd.(“Solstice”)的PCT公开号WO 2015/188197,Meade等人,Nature Biotechnology,2014,32:1256-1263(“Meade”),Merck Sharp&Dohme Corp的PCT公开号WO 2014/088920,其各自关于此类修饰的公开内容通过引用并入本文。核苷酸间二磷酸酯键的这种可逆修饰被设计成通过胞质溶胶的还原环境(例如谷胱甘肽)在细胞内裂解。较早的实例包括中和磷酸三酯修饰,据报道该修饰在细胞内是可裂解的(Dellinger等人J.Am.Chem.Soc.2003,125:940-950)。

[0366] 在一些实施方案中,这种可逆修饰允许在体内施用期间进行保护(例如,通过血液和/或细胞的溶酶体隔室/内体隔室转运),其中寡核苷酸将暴露于核酸酶和其他恶劣的环境条件(例如,pH)。当释放到其中谷胱甘肽的水平比细胞外空间更高的细胞胞质溶胶中时,修饰被逆转,并且结果是寡核苷酸被裂解。与使用不可逆化学修饰可获得的选择相比,使用可逆的谷胱甘肽敏感部分可将空间更大的化学基团引入感兴趣的寡核苷酸中。这是因为这些较大的化学基团将在胞质溶胶中被除去,并且因此不会干扰细胞胞质溶胶内寡核苷酸的生物学活性。结果,可工程化这些更大的化学基团以赋予核苷酸或寡核苷酸各种优点,诸如核酸酶抗性、亲脂性、电荷、热稳定性、特异性和降低的免疫原性。在一些实施方案中,可工程化谷胱甘肽敏感部分的结构以改变其释放的动力学。

[0367] 在一些实施方案中,谷胱甘肽敏感部分附接于核苷酸的糖。在一些实施方案中,谷胱甘肽敏感部分附接于经修饰的核苷酸的糖的2'-碳。在一些实施方案中,谷胱甘肽敏感部分位于糖的5'-碳上,特别是当经修饰的核苷酸为寡核苷酸的5'-末端核苷酸时。在一些实施方案中,谷胱甘肽敏感部分位于糖的3'-碳上,特别是当经修饰的核苷酸为寡核苷酸的3'-末端核苷酸时。在一些实施方案中,谷胱甘肽敏感部分包含磺酰基。参见,例如,于2016年8月23日提交的名称为“Compositions Comprising Reversibly Modified Oligonucleotides and Uses Thereof”的美国临时申请号62/378,635,其相关公开内容通过引用并入本文。

[0368] IV.靶向配体

[0369] 在一些实施方案中,可期望将本公开的寡核苷酸靶向一个或多个细胞或者一个或多个器官。这种策略可帮助避免在其他器官中的不良作用,或者可以避免寡核苷酸在不会有益于寡核苷酸的细胞、组织或器官中的不当损失。因此,在一些实施方案中,可修饰本文公开的寡核苷酸以促进靶向特定组织、细胞或器官,例如,以促进寡核苷酸向肝脏的递送。在某些实施方案中,本文公开的寡核苷酸可被修饰以促进寡核苷酸向肝的肝细胞的递送。在一些实施方案中,寡核苷酸包含缀合至一个或多个靶向配体的核苷酸。

[0370] 靶向配体可包含碳水化合物、氨基糖、胆固醇、肽、多肽、蛋白质或蛋白质的一部分(例如,抗体或抗体片段)或脂质。在一些实施方案中,靶向配体为适体。例如,靶向配体可以为:用于靶向肿瘤脉管系统或神经胶质瘤细胞的RGD肽;用于靶向肿瘤脉管系统或造口的CREKA肽;用于靶向CNS脉管系统上表达的运铁蛋白受体的运铁蛋白、乳铁蛋白或适体;或用于靶向神经胶质瘤细胞上的EGFR的抗EGFR抗体。在某些实施方案中,靶向配体为一个或多个GalNAc部分。

[0371] 在一些实施方案中,寡核苷酸的1个或多个(例如,1个、2个、3个、4个、5个或6个)核

苷酸各自缀合至单独的靶向配体。在一些实施方案中，寡核苷酸的2个至4个核苷酸各自缀合至单独的靶向配体。在一些实施方案中，靶向配体在正义链或反义链的任一端处缀合至2个至4个核苷酸(例如，配体在正义链或反义链的5’端或3’端上缀合至2个至4个核苷酸的突出端或延伸)，使得靶向配体类似于牙刷的刷毛并且寡核苷酸类似于牙刷。例如，寡核苷酸可在正义链的5’端或3’端处包含茎环，并且茎环的1个、2个、3个或4个核苷酸可分别缀合至靶向配体。

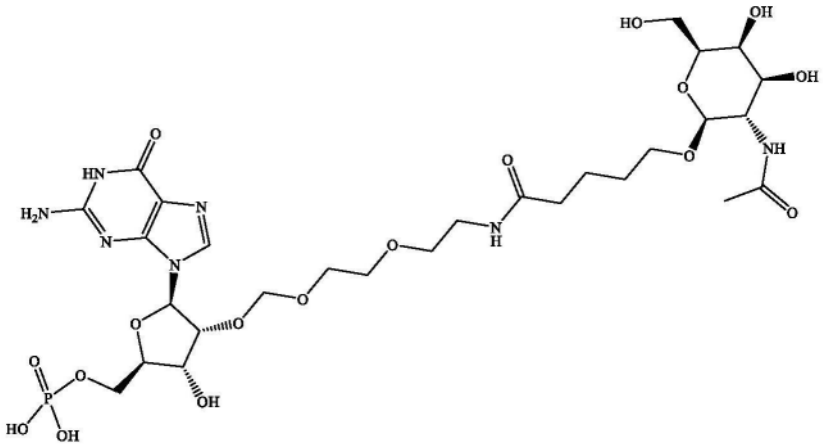
[0372] 在一些实施方案中，期望将减少HBV抗原的表达的寡核苷酸靶向受试者的肝脏的肝细胞。任何合适的肝细胞靶向部分都可用于该目的。

[0373] GalNAc是脱唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)的高亲和力配体，其主要在肝细胞的血窦面上表达，并且在结合、内化和随后清除包含末端半乳糖或N-乙酰半乳糖胺残基(脱唾液酸糖蛋白)的循环糖蛋白中具有主要作用。GalNAc部分与本公开的寡核苷酸的缀合(间接或直接)可用于将这些寡核苷酸靶向在这些肝细胞上表达的ASGPR。

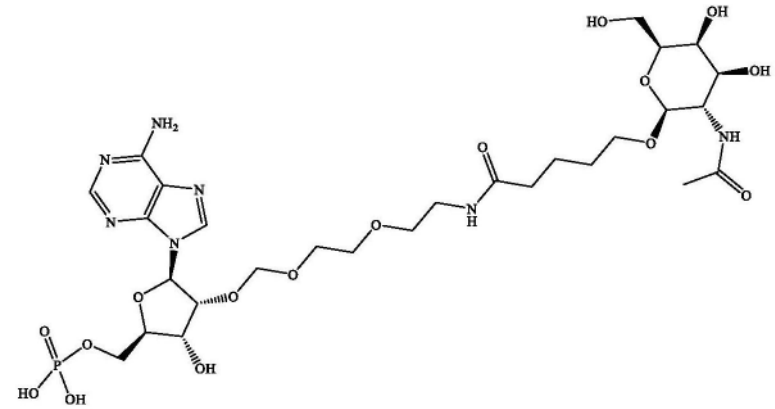
[0374] 在一些实施方案中，本公开的寡核苷酸直接或间接缀合至单价GalNAc。在一些实施方案中，寡核苷酸直接或间接缀合至多于一个单价GalNAc(即，缀合至2个、3个或4个单价GalNAc部分，并且通常缀合至3个或4个单价GalNAc部分)。在一些实施方案中，本公开的寡核苷酸缀合至一个或多个二价GalNAc、三价GalNAc或四价GalNAc部分。

[0375] 在一些实施方案中，寡核苷酸的1个或多个(例如，1个、2个、3个、4个、5个或6个)核苷酸各自缀合至GalNAc部分。在一些实施方案中，茎环的环(L)的2个至4个核苷酸各自缀合至单独的GalNAc。在一些实施方案中，靶向配体在正义链或反义链的任一端处缀合至2个至4个核苷酸(例如，配体在正义链或反义链的5’端或3’端缀合至2个至4个核苷酸的突出端或延伸)，使得GalNAc部分类似于牙刷的刷毛并且寡核苷酸类似于牙刷。例如，寡核苷酸可在正义链的5’端或3’端处包含茎环，并且茎环的1个、2个、3个或4个核苷酸可分别缀合至GalNAc部分。在一些实施方案中，GalNAc部分缀合至正义链的核苷酸。例如，可将四个GalNAc部分缀合至正义链的四环中的核苷酸，其中每个GalNAc部分缀合至一个核苷酸。

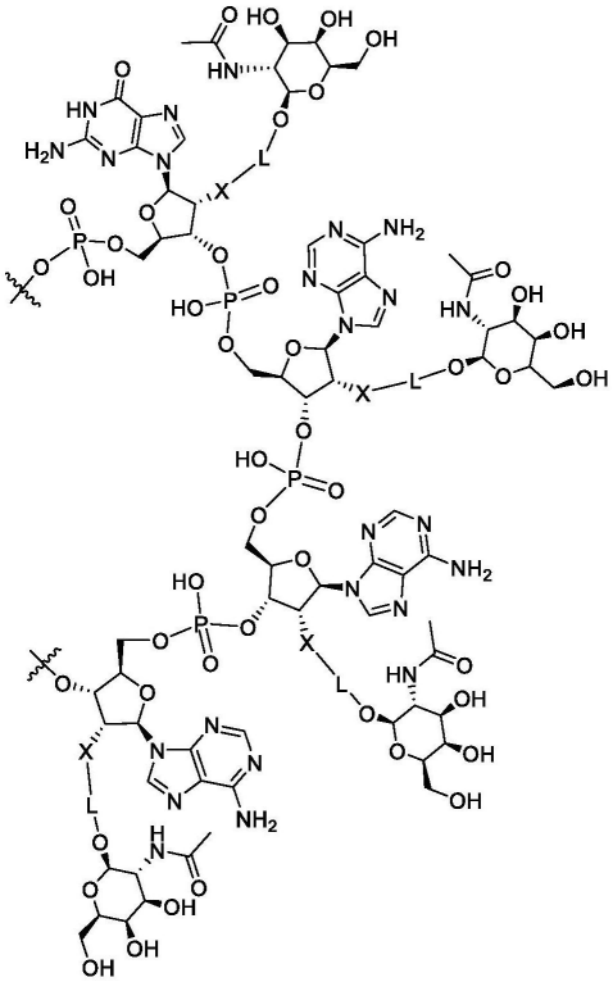
[0376] 在一些实施方案中，本文的寡核苷酸包含附接于胍核苷酸的单价GalNAc，称为[ademG-GalNAc]或2’-氨基二乙氧基甲醇-胍-GalNAc，如下所示：

[0377] 

[0378] 在一些实施方案中，本文的寡核苷酸包含附接于腺嘌呤核苷酸的单价GalNAc，称为[ademA-GalNAc]或2’-氨基二乙氧基甲醇-腺嘌呤-GalNAc，如下所示：

[0379] 

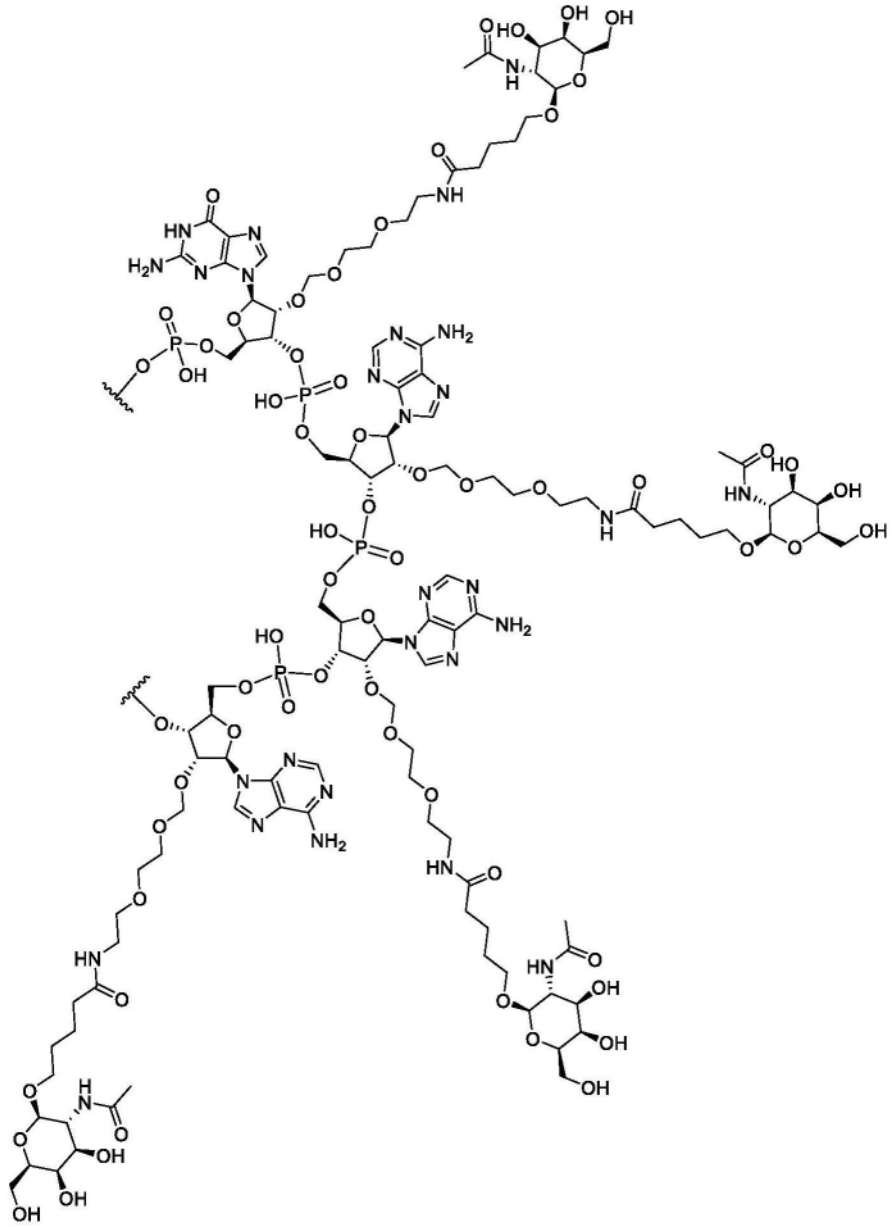
[0380] 下文显示了这种缀合的实例，其显示了包含从5’至3’的核苷酸序列GAAA(L＝接头，X＝杂原子)茎附接点的环。这种环可存在于例如图20所示的分子的第27位至第30位处。在化学式中，~~为至寡核苷酸链的附接点。

[0381] 

[0382] 可使用适当的方法或化学方法(例如，点击化学)将靶向配体联接至核苷酸。在一些实施方案中，使用点击接头将靶向配体缀合至核苷酸。在一些实施方案中，基于乙缩醛的接头用于将靶向配体缀合至本文所述的寡核苷酸中的任一种寡核苷酸的核苷酸。基于乙缩醛的接头公开于例如2016年6月23日公开的国际专利申请公开号WO2016100401 A1中，并且其涉及此类接头的内容通过引用并入本文。在一些实施方案中，接头为不稳定的接头。然而，在其他实施方案中，接头是相当稳定的。

[0383] 下文显示了一个实例，其为包含从5’至3’的核苷酸GAAA的环，其中GalNAc部分使用乙缩醛接头附接于环的核苷酸。这种环可存在于例如图20所示的分子的第27位至第30位处。在化学式中，为至寡核苷酸链的附接点。

[0384]



[0385] 4.进一步的靶向HBV的GalNAc缀合的治疗性寡核苷酸

[0386] 在一个实施方案中，本发明的寡核苷酸为靶向HBV mRNA的治疗性寡核苷酸，并且其通过缀合至脱唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)靶向缀合物(诸如二价、三价或四价GalNAc簇)改善了向肝脏的递送，特别是向肝细胞的递送(图1中的示例性实例)。WO2015/173208描述了此类靶向HBV mRNA(SEQ ID NO:1)的GalNAc缀合的反义寡核苷酸及其产生。

[0387] 本发明的药物组合中的GalNAc缀合的治疗性寡核苷酸能够减少从HBV mRNA(靶核酸)的表达，特别是乙型肝炎病毒的HBsAg和HBx的表达，两者均从SEQ ID NO:1编码。此外，本发明的GalNAc缀合的治疗性寡核苷酸优选地能够减少从染色体整合的HBV片段的HBsAg表达。

[0388] 在一些实施方案中，本发明的GalNAc缀合的治疗性寡核苷酸结合至靶核酸，并且与正常表达水平相比减少表达至少10％或20％，更优选地与正常表达水平(例如在GalNAc缀合的治疗性寡核苷酸不存在的情况下的表达水平)相比减少至少30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％或95％。

[0389] 在一个实施方案中，本发明的GalNAc缀合的治疗性寡核苷酸能够下调(例如抑制、减少或除去)HBx或HBsAg基因的表达。这种下调通常可发生在靶细胞(例如哺乳动物细胞，例如人类细胞，例如肝脏细胞，例如肝细胞)中，特别是发生在HBV感染的肝细胞中。在一些实施方案中，本发明的GalNAc缀合的治疗性寡核苷酸结合至靶核酸，并且与正常表达水平相比影响抑制至少50％的表达，更优选地与正常表达水平(例如在GalNAc缀合的治疗性寡核苷酸不存在的情况下的表达水平)相比抑制至少60％、70％、80％、90％或95％。HBV mRNA和HBsAg和HBV DNA的表达水平的调节可使用“材料和方法”章节中描述的方法来确定。

[0390] 本发明的一个方面涉及一种治疗性寡核苷酸，该治疗性寡核苷酸包含长度为12个至30个核苷酸的连续核苷酸序列，该连续核苷酸序列与SEQ ID NO:1的第1530位至第1602位具有至少90％的互补性。

[0391] 在本发明的一个实施方案中，该治疗性寡核苷酸与选自以下项的序列互补：SEQ ID NO:1的第1530位至第1602位、第1530位至第1598位、第1530位至第1543位、第1530位至第1544位、第1531位至第1543位、第1551位至第1565位、第1551位至第1566位、第1577位至第1589位、第1577位至第1591位、第1577位至第1592位、第1578位至第1590位、第1578位至第1592位、第1583位至第1598位、第1584位至第1598位、第1585位至第1598位以及第1583位至第1602位。特别地，治疗性寡核苷酸与来自第1530位至第1544位、第1531位至第1543位、第1583位至第1602位以及第1583位至第1598位的靶序列具有100％的互补性是有利的。

[0392] 在一些实施方案中，该治疗性寡核苷酸包含长度为12个至30个核苷酸的连续序列，其与靶核酸的区域或靶序列至少91％互补，诸如至少92％、诸如至少93％、诸如至少94％、诸如至少95％、诸如至少96％、诸如至少97％、诸如至少98％、至少99％或100％互补。

[0393] 有利的情况是，该连续核苷酸序列与选自由以下项组成的组的靶序列中的连续序列完全互补(100％互补)：SEQ ID NO:1的第1530位至第1602位、第1530位至第1598位、第1530位至第1543位、第1530位至第1544位、第1531位至第1543位、第1551位至第1565位、第1551位至第1566位、第1577位至第1589位、第1577位至第1591位、第1577位至第1592位、第1578位至第1590位、第1578位至第1592位、第1583位至第1598位、第1584位至第1598位、第1585位至第1598位或第1583位至第1602位，或者在一些实施方案中，该连续核苷酸序列可包含治疗性寡核苷酸与靶序列之间的一个或两个错配。

[0394] 在本发明的一个实施方案中，GalNAc缀合的反义寡核苷酸的长度为13个至20个核苷酸，其具有与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:28的从第1530位至第1602位的连续序列100％互补的至少12个核苷酸的连续核苷酸序列。应当理解，该化合物与TLR7激动剂组合，如关于TLR7激动剂的章节所述

[0395] 在一些实施方案中，本发明的反义寡核苷酸包含以下项或由以下项组成：长度为13个至24个核苷酸，诸如13个至22个核苷酸，诸如长度为14个至20个连续核苷酸。在一个优选的实施方案中，反义寡核苷酸包含以下项或由以下项组成：长度为13个至18个核苷酸，诸如长度为15个至18个核苷酸。

[0396] 在一些实施方案中，其连续核苷酸序列包含以下项或由以下项组成：长度为12个至20个核苷酸，诸如12个至18个核苷酸，诸如13个至17个核苷酸，诸如13个至15个核苷酸，诸如长度为13个、14个、15个、16个或17个核苷酸。应当理解，该连续核苷酸序列总是等于或短于反义寡核苷酸的总长度，因为反义寡核苷酸可包含附加的核苷，该附加的核苷用作例如在该连续核苷酸序列与缀合物之间的可生物裂解的接头。还应理解，本文给出的任何范围都包含范围端点。因此，如果说反义寡核苷酸包含12个至30个核苷酸，则包括12个和30个核苷酸两者。

[0397] 在一些实施方案中，该连续核苷酸序列包含选自由以下项组成的组的序列或者由选自由以下项组成的组的序列组成：

[0398] gcgtaaagagagg(SEQ ID NO:2)；

[0399] gcgtaaagagaggt(SEQ ID NO:3)；

[0400] cgcgtaaagagaggt(SEQ ID NO 4)；

[0401] agaaggcacagacgg(SEQ ID NO 5)；

[0402] gagaaggcacagacgg(SEQ ID NO 6)；

[0403] agcgaagtgcacacgg(SEQ ID NO 7)；

[0404] gaagtgcacacgg(SEQ ID NO 8)；

[0405] gcgaagtgcacacgg(SEQ ID NO 9)；

[0406] agcgaagtgcacacg(SEQ ID NO:10)；

[0407] cgaagtgcacacg(SEQ ID NO 11)；

[0408] aggtgaagcgaagtgc(SEQ ID NO:12)；

[0409] aggtgaagcgaagtg(SEQ ID NO:13)；

[0410] aggtgaagcgaagt(SEQ ID NO 14)；和

[0411] gcagaggtgaagcgaagtgc(SEQ ID NO:29)。

[0412] 在一些实施方案中，反义寡核苷酸包含长度为12个至22个核苷酸或由其组成，其中至少12个核苷酸的连续核苷酸序列与选自由以下项组成的组的序列具有至少90％的同一性，优选为100％的同一性：

[0413] gcgtaaagagagg(SEQ ID NO:2)；

[0414] gcgtaaagagaggt(SEQ ID NO:3)；和

[0415] cgcgtaaagagaggt(SEQ ID NO 4)。

[0416] 在一些实施方案中，反义寡核苷酸包含长度为12个至22个核苷酸或由其组成，其中至少12个核苷酸的连续核苷酸序列与选自以下项的序列具有至少90％的同一性，优选为100％的同一性：

[0417] agaaggcacagacgg(SEQ ID NO 5)；或

[0418] gagaaggcacagacgg(SEQ ID NO 6)。

[0419] 在一些实施方案中，反义寡核苷酸包含长度为12个至22个核苷酸或由其组成，其中至少12个核苷酸的连续核苷酸序列与选自由以下项组成的组的序列具有至少90％的同一性，优选为100％的同一性：

[0420] agcgaagtgcacacgg(SEQ ID NO 7)；

[0421] gaagtgcacacgg(SEQ ID NO 8)；

[0422] gcgaagtgcacacgg(SEQ ID NO 9)；

[0423] agcgaagtgcacacg(SEQ ID NO:10)；

[0424] cgaagtgcacacg(SEQ ID NO 11)；

[0425] aggtgaagcgaagtgc(SEQ ID NO:12)；

[0426] aggtgaagcgaagtg(SEQ ID NO:13)；

[0427] aggtgaagcgaagt(SEQ ID NO 14)；和

[0428] gcagaggtgaagcgaagtgc(SEQ ID NO:29)。

[0429] 在一些实施方案中，反义寡核苷酸包含长度为12个至22个核苷酸或由其组成，其中至少12个核苷酸的连续核苷酸序列与选自由以下项组成的组的序列具有至少90％的同一性，优选为100％的同一性：

[0430] aggtgaagcgaagtgc(SEQ ID NO:12)；

[0431] aggtgaagcgaagtg(SEQ ID NO:13)；

[0432] aggtgaagcgaagt(SEQ ID NO 14)；和

[0433] gcagaggtgaagcgaagtgc(SEQ ID NO:29)。

[0434] 5.本发明的反义寡核苷酸的寡核苷酸修饰

[0435] 本节中讨论的修饰尤其优选用于在本发明的反义寡核苷酸中实施。

[0436] 应理解的是，邻接核碱基序列(基序序列)可经修饰以例如增加核酸酶抗性和/或对靶核酸的结合亲和力。

[0437] 在一个实施方案中，寡核苷酸的连续核碱基序列包含至少一个经修饰的核苷间键。合适的核苷间修饰描述于“定义”章节的“修饰的核苷间键”下。有利的情况是，连续核苷酸序列内的至少75％(诸如所有)的核苷间键为核苷间键。在一些实施方案中，寡核苷酸的邻接序列中的所有核苷酸间键是硫代磷酸酯键。

[0438] 本发明的寡核苷酸设计有经修饰的核苷和DNA核苷。优选地，使用高亲和力修饰的核苷。

[0439] 在一个实施方案中，寡核苷酸包含至少3个经修饰的核苷，诸如至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个或至少16个经修饰的核苷。在一个实施方案中，寡核苷酸包含3个至8个经修饰的核苷，诸如4个至6个经修饰的核苷，诸如4个、5个或6个核苷，诸如5个或6个经修饰的核苷。合适的修饰在“定义”章节的“修饰的核苷”、“高亲和力修饰的核苷”、“糖修饰”、“2′糖修饰”和“锁定的核酸(LNA)”下进行了描述。

[0440] 在一个实施方案中，寡核苷酸包含一个或多个糖修饰的核苷，例如2’糖修饰的核苷。优选地，本发明的寡核苷酸包含一个或多个2’糖修饰的核苷，其独立地选自2’-O-烷基-RNA、2’-O-甲基-RNA、2’-烷氧基-RNA、2’-O-甲氧基乙基-RNA、2’-氨基-DNA、2’-氟-DNA、阿拉伯糖核酸(ANA)、2’-氟-ANA和LNA核苷。优选的情况是，一个或多个或者所有经修饰的核苷为锁定的核酸(LNA)。

[0441] 在一些实施方案中，本发明的寡核苷酸，例如连续核苷酸序列，包含至少一个LNA核苷，诸如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个或8个LNA核苷，诸如2个至6个LNA核苷，诸如3个至6个LNA核苷、4个至6个LNA核苷或者4个、5个或6个LNA核苷。

[0442] 在一些实施方案中，寡核苷酸中至少75％的经修饰的核苷为LNA核苷，诸如至少

80％、诸如至少85％、诸如至少90％的经修饰的核苷为LNA核苷。在另一个实施方案中，寡核苷酸中所有修饰的核苷均为LNA核苷。在进一步的实施方案中，LNA核苷选自呈β-D或α-L构型的β-D-氧基-LNA、硫代-LNA、氨基-LNA、氧基-LNA、ScET和/或ENA或它们的组合。在进一步的实施方案中，所有LNA核苷都为β-D-氧基-LNA。在进一步的实施方案中，胞嘧啶单元为5-甲基-胞嘧啶。对于寡核苷酸或连续核苷酸序列的核酸酶稳定性而言，优选的是在核苷酸序列的5’端具有至少1个LNA核苷并且在核苷酸序列的3’端具有至少2个LNA核苷。

[0443] 6.针对RNase H募集的反义寡核苷酸设计

[0444] 在本发明的一个实施方案中，其中治疗性寡核苷酸为反义寡核苷酸，本发明的寡核苷酸能够在与靶核酸杂交时募集RNase H。

[0445] 将修饰的核苷(例如高亲和力修饰的核苷)掺入寡核苷酸序列中的模式通常称为寡核苷酸设计。

[0446] 在本发明的一个实施方案中，其中治疗性寡核苷酸为反义寡核苷酸，有利的结构设计为例如“定义”章节中“缺口聚体”、“LNA缺口聚体”、“MOE缺口聚体”和“混合型翼缺口聚体”下描述的缺口聚体设计。缺口聚体设计包括具有一致侧翼和混合型翼侧翼的缺口聚体。在本发明中，有利的情况是，本发明的连续核苷酸序列为具有F-G-F’设计的缺口聚体。在一些实施方案中，缺口聚体为LNA或MOE缺口聚体，其具有以下一致的侧翼设计：3-7-3、3-8-2、3-8-3、2-9-4、3-9-3、3-10-3或5-10-5。

[0447] 在一些实施方案中，反义寡核苷酸包含长度为12个至22个核苷酸或由其组成，其具有选自由以下项组成的组的连续核苷酸序列：

[0448] GCGtaaagagaGG(SEQ ID NO:2)；

[0449] GCGtaaagagAGG(SEQ ID NO:2)；

[0450] GCGtaaagagaGGT(SEQ ID NO:3)；

[0451] CGCgtaaagagaGGT(SEQ ID NO:4)；

[0452] AGAaggcacagaCGG(SEQ ID NO:5)；

[0453] GAGaaggcacagaCGG(SEQ ID NO:6)；

[0454] AGCgaagtgcacaCGG(SEQ ID NO:7)；

[0455] GAAgtgcacacGG(SEQ ID NO:8)；

[0456] GAAgtgcacaCGG(SEQ ID NO:8)；

[0457] GCGaagtgcacaCGG(SEQ ID NO:9)；

[0458] AGCgaagtgcacACG(SEQ ID NO:10)；

[0459] CGAagtgcacaCG(SEQ ID NO:11)；

[0460] AGGtgaagcgaagTGC(SEQ ID NO:12)；

[0461] AGGtgaagcgaaGTG(SEQ ID NO:13)；

[0462] AGgtgaagcgaAGTG(SEQ ID NO:13)；和

[0463] AGGtgaagcgaAGT(SEQ ID NO:14)；

[0464] 其中大写字母表示LNA核苷，例如β-D-氧基-LNA，并且小写字母表示DNA核苷。

[0465] 在一些实施方案中，反义寡核苷酸包含长度为12个至22个核苷酸或由其组成，其具有选自由以下项组成的组的连续核苷酸序列：

[0466] GCGtaaagagaGG(SEQ ID NO:2)；

[0467] GCGtaaagagAGG(SEQ ID NO:2)；

[0468] GCGtaaagagaGGT(SEQ ID NO:3)；和

[0469] CGCgtaaagagaGGT(SEQ ID NO:4)；

[0470] 其中大写字母表示LNA核苷，例如β-D-氧基-LNA，并且小写字母表示DNA核苷。

[0471] 在一些实施方案中，反义寡核苷酸包含长度为12个至22个核苷酸或由其组成，其具有由以下项组成的连续核苷酸序列：

[0472] AGAaggcacagaCGG(SEQ ID NO:5)；或

[0473] GAGaaggcacagaCGG(SEQ ID NO:6)；

[0474] 其中大写字母表示LNA核苷，例如β-D-氧基-LNA，并且小写字母表示DNA核苷。

[0475] 在一些实施方案中，反义寡核苷酸包含长度为12个至22个核苷酸或由其组成，其具有选自由以下项组成的组的连续核苷酸序列：

[0476] AGCgaagtgcacaCGG(SEQ ID NO:7)；

[0477] GAAgtgcacacGG(SEQ ID NO:8)；

[0478] GAAgtgcacaCGG(SEQ ID NO:8)；

[0479] GCGaagtgcacaCGG(SEQ ID NO:9)；

[0480] AGCgaagtgcacACG(SEQ ID NO:10)；

[0481] CGAagtgcacaCG(SEQ ID NO:11)；

[0482] AGGtgaagcgaagTGC(SEQ ID NO:12)；

[0483] AGGtgaagcgaaGTG(SEQ ID NO:13)；

[0484] AGgtgaagcgaAGTG(SEQ ID NO:13)；和

[0485] AGGtgaagcgaAGT(SEQ ID NO:14)；

[0486] 其中大写字母表示LNA核苷，例如β-D-氧基-LNA，并且小写字母表示DNA核苷。

[0487] 在一些实施方案中，反义寡核苷酸包含长度为12个至22个核苷酸或由其组成，其具有选自由以下项组成的组的连续核苷酸序列：

[0488] AGGtgaagcgaagTGC(SEQ ID NO:12)；

[0489] AGGtgaagcgaaGTG(SEQ ID NO:13)；

[0490] AGgtgaagcgaAGTG(SEQ ID NO:13)；和

[0491] AGGtgaagcgaAGT(SEQ ID NO:14)；

[0492] 其中大写字母表示LNA核苷，例如β-D-氧基-LNA，并且小写字母表示DNA核苷。

[0493] 在一些实施方案中，反义寡核苷酸包含长度为20个至24个核苷酸或由其组成，其具有以下连续核苷酸序列：

[0494] GCAGAggtgaagcgaAGTGC(SEQ ID NO:29)；

[0495] 其中带下划线的大写字母表示MOE核苷，并且小写字母表示DNA核苷。

[0496] 下表1汇总了靶向SEQ ID NO:1的第1530位至第1602位的反义寡核苷酸的连续核苷酸序列的基序序列以及旨在用于本发明的这些的缺口聚体设计。

[0497] 表1

[0498]

SEQ ID NO	SEQ ID NO: 1上的位置	基序序列	设计
2	1531-1543	gcgtaaagagagg	GCGtaaagagaGG
			GCGtaaagagAGG
3	1530-1543	gcgtaaagagaggt	GCGtaaagagaGGT
4	1530-1544	cgcgtaaagagaggt	CGCgtaaagagaGGT
5	1551-1565	agaaggcacagacgg	AGAaggcacagaCGG
6	1551-1566	gagaaggcacagacgg	GAGaaggcacagaCGG
7	1577-1592	agcgaagtgcacacgg	AGCgaagtgcacaCGG
8	1577-1589	gaagtgcacacgg	GAAgtgcacacGG
			GAAgtgcacaCGG
9	1577-1591	gcgaagtgcacacgg	GCGaagtgcacaCGG
10	1578-1592	agcgaagtgcacacg	AGCgaagtgcacACG
11	1578-1590	cgaagtgcacacg	CGAagtgcacaCG
12	1583-1598	aggtgaagcgaagtgc	AGGtgaagcgaagTGC

[0499]

13	1584-1598	aggtgaagcgaagtg	AGGtgaagcgaaGTG
			AGgtgaagcgaAGTG
14	1585-1598	aggtgaagcgaagt	AGGtgaagcgaAGT
29	1583-1602	gcagaggtgaagcgaagtgc	GCAGAggtgaagcgaAGTGC

[0500] 在表1的设计一列中，大写字母表示2'-糖修饰的核苷，特别是LNA核苷，诸如β-D-氧基-LNA或MOE核苷，并且小写字母表示DNA核苷。核苷间键可以为磷酸二酯或硫代磷酸酯。在一些实施方案中，所有核苷间键都为硫代磷酸酯。

[0501] 在所有情况下，反义寡核苷酸可进一步在F-G-F'设计的5'端或3'端处包含区域D'和/或D"，如"定义"章节中"寡核苷酸中的区域D'或D""下所述。在一些实施方案中，本发明的反义寡核苷酸在缺口聚体区的5'端或3'端处具有1个至5个(诸如1个、2个或3个)磷酸二酯联接的核苷单元，诸如DNA单元。DNA核苷通常具有如核碱基定义中所定义的核碱基，诸如具有选自嘌呤(例如腺嘌呤和鸟嘌呤)和嘧啶(例如尿嘧啶、胸腺嘧啶和胞嘧啶)的核碱基的天然存在的DNA核苷。在一些实施方案中，本发明的反义寡核苷酸由两个5'磷酸二酯联接的DNA核苷和随后的如"定义"章节中所定义的F-G-F'缺口聚体区组成。在5'或3'端含有磷酸二酯连接的DNA单元的寡核苷酸适用于缀合，并且可以进一步包含本文所述的缀合物部分。对于递送至肝脏，ASGPR靶向部分作为缀合物部分是特别优选的。

[0502] 在一些实施方案中，反义寡核苷酸包含选自由以下项组成的组的序列或者由选自由以下项组成的组的序列组成：

[0503] cagcgtaaagagagg(SEQ ID NO:15)

[0504] cagcgtaaagagaggt(SEQ ID NO:16)

[0505] cacgcgtaaagagaggt(SEQ ID NO:17)

[0506] caagaaggcacagacgg(SEQ ID NO:18)

[0507] cagagaaggcacagacgg(SEQ ID NO:19)

[0508] caagcgaagtgcacacgg(SEQ ID NO:20)

[0509] cagaagtgcacacgg(SEQ ID NO:21)

[0510] cagcgaagtgcacacgg(SEQ ID NO:22)

[0511] caagcgaagtgcacacg(SEQ ID NO:23)

[0512] cacgaagtgcacacg(SEQ ID NO:24)

[0513] caaggtgaagcgaagtgc(SEQ ID NO:25)

[0514] caaggtgaagcgaagtg(SEQ ID NO:26)

[0515] caaggtgaagcgaagt(SEQ ID NO:27)

[0516] 其中从第1位到第3位(从5'端开始)的核苷之间的核苷间键为磷酸二酯键,并且第3位和第4位中的核苷之间的核苷间键为硫代磷酸酯键(其中第3位处的核苷为连续核苷酸序列的5'端)。有利的情况是,寡核苷酸的第4位之后到3'端的所有核苷间键都为硫代磷酸酯键。在一个实施方案中,连续核苷酸序列具有表1中的对应序列的设计。

[0517] 7.结合至脱唾液酸糖蛋白的缀合物

[0518] 能够结合至脱唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)的缀合物对于靶向肝脏中的肝细胞是特别有用的。包含选自由以下项组成的组的至少两个碳水化合物部分的缀合物通常能够结合ASGPR:半乳糖、半乳糖胺、N-甲酰基-半乳糖胺、N-乙酰半乳糖胺、N-丙酰基-半乳糖胺、N-正丁酰基-半乳糖胺和N-异丁酰基半乳糖胺。N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)部分已显示出在靶向ASGPR方面具有优势,但也可使用上面列表中的另选物,例如半乳糖。在一个实施方案中,缀合物由联接至间隔物的二至四个末端GalNAc部分组成,该间隔物将每个GalNAc部分联接至支链分子,从而形成可缀合至治疗性寡核苷酸的簇。

[0519] GalNAc簇可例如通过将GalNAc部分通过其C-1碳联接至间隔物来生成。优选的间隔物为柔性亲水性间隔物(美国专利5885968;Biessen等人J.Med.Chem.第1995卷39第1538-1546页)。优选的柔性亲水性间隔物为PEG间隔物。优选的PEG间隔物为PEG3间隔物。分支点可以为任何这样的小分子,其允许两个至三个GalNAc部分(或其他脱唾液酸糖蛋白受体靶向部分)附接于寡核苷酸,并且进一步允许分支点附接于寡核苷酸,此类构建体被称为GalNAc簇或GalNAc缀合物。示例性的分支点基团为二赖氨酸。二赖氨酸分子包含:三个胺基团,三个GalNAc部分或其他脱唾液酸糖蛋白受体靶向部分可通过该三个胺基团附接于寡聚物;和羧基反应性基团,二赖氨酸可通过该羧基反应性基团附接于寡聚物。Khorev等人2008Bioorg.Med.Chem.第16页,第5216页也描述了合适的三价支化剂(brancher)的合成。其他可商购获得的支化剂为1,3-双-[5-(4,4'-二甲氧基三苯甲氧基)戊基氨基]丙基-2-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)]亚磷酰胺(Glen Research目录号:10-1920-xx);三-2,2,2-[3-(4,4'-二甲氧基三苯甲氧基)丙氧基甲基]乙基-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺(Glen Research目录号:10-1922-xx);和

[0520] 三-2,2,2-[3-(4,4'-二甲氧基三苯甲氧基)丙氧基甲基]亚甲氧基丙基-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺;和1-[5-(4,4'-二甲氧基-三苯甲氧基)戊酰胺基]-3-[5-芴甲氧基-羰基-氧基-戊酰胺基]-丙基-2-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺(Glen Research目录号:10-1925-xx)。其他GalNAc簇可以为:附接有GalNAc部分的小肽,例如Tyr-Glu-Glu-(氨基己基GalNAc)3(YEE(ahGalNAc)3;与肝细胞上的脱唾液酸糖蛋白受体结合的糖三肽,参见,例如,Duff,等人,Methods Enzymol,2000,313,297;基于赖氨酸的半乳糖簇(例如,L3G4;Biessen,等人,Cardovasc.Med.,1999,214);和基于胆烷的半乳糖簇

(例如,脱唾液酸糖蛋白受体的碳水化合物识别基序)。

[0521] 在本发明的一个实施方案中,本发明的治疗性寡核苷酸缀合至GalNAc簇以改善寡核苷酸的药理学,例如通过影响寡核苷酸在肝细胞中的细胞分布,特别是细胞摄取。

[0522] 合适的GalNAc缀合物是那些能够与脱唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)结合的缀合物,诸如二价、三价或四价GalNAc簇。特别地,三价N-乙酰半乳糖胺缀合物适用于结合至ASGPR,参见例如WO 2014/076196、WO 2014/207232、WO 2014/179620、WO 2016/055601和WO 2017/178656(通过引用并入本文)。图1是已至少经过了体外测试的合适的GalNAc缀合物的表示。然而,如果另选的GalNAc缀合物能够结合脱唾液酸糖蛋白受体,则它们也可能是合适的。此类缀合物用于增强肝脏对寡核苷酸的摄取,同时减少寡核苷酸在肾脏中的存在,从而与相同寡核苷酸的非缀合形式相比,增加GalNAc缀合的寡核苷酸的肝脏/肾脏比率。

[0523] 可使用本领域已知的方法将GalNAc簇附接于寡核苷酸的3'-端或5'-端。在一个实施方案中,GalNAc簇联接至寡核苷酸的5'-端。

[0524] 可在缀合物(例如在缀合物部分的支链部分处)与寡核苷酸之间插入一个或多个接头。有利的是,在缀合物部分与治疗性寡核苷酸之间具有可生物裂解的接头,任选地与不可裂解的接头(例如C6接头)组合使用。接头可选自"定义"章节中"接头"下描述的接头,特别地,可生物裂解的区域D'或D"接头是有利的。在缀合物与缺口聚体或连续核苷酸序列之间具有可生物裂解的接头的GalNAc缀合的寡核苷酸是有效的前药,因为GalNAc簇和可生物裂解的PO接头在进入细胞时从缺口聚体或连续核苷酸序列中被除去。

[0525] 在一个实施方案中,缀合物部分为三价N-乙酰半乳糖胺(GalNAc),诸如图1所示的那些。

[0526] 在一个实施方案中,其中GalNAc缀合的反义寡核苷酸选自由以下项组成的组:

[0527] 5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$G$_s$^{m}C$_s$G$_s$t$_s$a$_s$a$_s$a$_s$g$_s$a$_s$g$_s$a$_s$G$_s$G-3' SEQ ID NO:15

[0528] 5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$G$_s$^{m}C$_s$G$_s$t$_s$a$_s$a$_s$a$_s$g$_s$a$_s$g$_s$A$_s$G$_s$G-3' SEQ ID NO:15

[0529] 5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$G$_s$^{m}C$_s$G$_s$t$_s$a$_s$a$_s$a$_s$g$_s$a$_s$g$_s$a$_s$G$_s$G$_s$T-3' SEQ ID NO:16

[0530] 5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$^{m}C$_s$G$_s$^{m}C$_s$g$_s$t$_s$a$_s$a$_s$a$_s$g$_s$a$_s$g$_s$a$_s$G$_s$G$_s$T-3' SEQ ID NO:17

[0531] 5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$A$_s$G$_s$A$_s$a$_s$g$_s$g$_s$c$_s$a$_s$c$_s$a$_s$g$_s$a$_s$^{m}C$_s$G$_s$G-3' SEQ ID NO:18

[0532] 5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$G$_s$A$_s$G$_s$a$_s$a$_s$g$_s$g$_s$c$_s$a$_s$c$_s$a$_s$g$_s$a$_s$^{m}C$_s$G$_s$G-3' SEQ ID NO:19

[0533] 5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$A$_s$G$_s$mC$_s$g$_s$a$_s$a$_s$g$_s$t$_s$g$_s$c$_s$a$_s$c$_s$a$_s$^{m}C$_s$G$_s$G-3' SEQ ID NO:20

[0534] 5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$G$_s$A$_s$A$_s$g$_s$t$_s$g$_s$c$_s$a$_s$c$_s$a$_s$^{m}c$_s$G$_s$G-3' SEQ ID NO:21

[0535] 5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$G$_s$A$_s$A$_s$g$_s$t$_s$g$_s$c$_s$a$_s$c$_s$a$_s$^{m}C$_s$G$_s$G-3' SEQ ID NO:21

[0536] 5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$G$_s$^{m}C$_s$G$_s$a$_s$a$_s$g$_s$t$_s$g$_s$c$_s$a$_s$c$_s$a$_s$^{m}C$_s$G$_s$G-3' SEQ ID NO:22

[0537] 5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$A$_s$G$_s$^{m}C$_s$g$_s$a$_s$a$_s$g$_s$t$_s$g$_s$c$_s$a$_s$c$_s$A$_s$^{m}C$_s$G-3' SEQ ID NO:23

[0538] 5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$^{m}C$_s$G$_s$A$_s$a$_s$g$_s$t$_s$g$_s$c$_s$a$_s$c$_s$a$_s$^{m}C$_s$G-3' SEQ ID NO:24

[0539] 5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$A$_s$G$_s$G$_s$t$_s$g$_s$a$_s$a$_s$g$_s$^{m}c$_s$g$_s$a$_s$a$_s$g$_s$T$_s$G$_s$^{m}C-3' SEQ ID NO:25

[0540] 5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$A$_s$G$_s$g$_s$t$_s$g$_s$a$_s$a$_s$g$_s$^{m}c$_s$g$_s$a$_s$A$_s$G$_s$T$_s$G-3' SEQ ID NO:26

[0541] 5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$A$_s$G$_s$G$_s$t$_s$g$_s$a$_s$a$_s$g$_s$^{m}c$_s$g$_s$a$_s$a$_s$G$_s$T$_s$G-3' SEQ ID NO:26;和

[0542] 5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$A$_s$G$_s$G$_s$t$_s$g$_s$a$_s$a$_s$g$_s$^{m}c$_s$g$_s$a$_s$A$_s$G$_s$T-3' SEQ ID NO:27

[0543] 其中大写字母表示β-D-氧基-LNA单元;小写字母表示DNA单元;下标"o"表示磷酸二酯键;下标"s"表示硫代磷酸酯键;上标m表示含有5-甲基胞嘧啶碱基的DNA或β-D-氧基-

LNA单元;GN2-C6表示具有C6接头的GalNAc2缀合物。

[0544] 在一个实施方案中,其中GalNAc缀合的反义寡核苷酸选自由以下项组成的组:

[0545] 5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$G$_s$^{m}C$_s$G$_s$t$_s$a$_s$a$_s$a$_s$g$_s$a$_s$g$_s$a$_s$G$_s$G-3' SEQ ID NO:15

[0546] 5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$G$_s$^{m}C$_s$G$_s$t$_s$a$_s$a$_s$a$_s$g$_s$a$_s$g$_s$A$_s$G$_s$G-3' SEQ ID NO:15

[0547] 5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$G$_s$^{m}C$_s$G$_s$t$_s$a$_s$a$_s$a$_s$g$_s$a$_s$g$_s$a$_s$G$_s$G$_s$T-3' SEQ ID NO:16;和

[0548] 5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$^{m}C$_s$G$_s$^{m}C$_s$g$_s$t$_s$a$_s$a$_s$a$_s$g$_s$a$_s$g$_s$a$_s$G$_s$G$_s$T-3' SEQ ID NO:17

[0549] 其中大写字母表示β-D-氧基-LNA单元;小写字母表示DNA单元;下标"o"表示磷酸二酯键;下标"s"表示硫代磷酸酯键;上标m表示含有5-甲基胞嘧啶碱基的DNA或β-D-氧基-LNA单元;GN2-C6表示具有C6接头的GalNAc2缀合物。

[0550] 在一个实施方案中,其中GalNAc缀合的反义寡核苷酸为

[0551] 5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$A$_s$G$_s$A$_s$a$_s$g$_s$g$_s$c$_s$a$_s$c$_s$a$_s$g$_s$a$_s$^{m}C$_s$G$_s$G-3' SEQ ID NO:18或

[0552] 5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$G$_s$A$_s$G$_s$a$_s$a$_s$g$_s$g$_s$c$_s$a$_s$c$_s$a$_s$g$_s$a$_s$^{m}C$_s$G$_s$G-3' SEQ ID NO:19

[0553] 其中大写字母表示β-D-氧基-LNA单元;小写字母表示DNA单元;下标"o"表示磷酸二酯键;下标"s"表示硫代磷酸酯键;上标m表示含有5-甲基胞嘧啶碱基的DNA或β-D-氧基-LNA单元;GN2-C6表示具有C6接头的GalNAc2缀合物。

[0554] 在一个实施方案中,其中GalNAc缀合的反义寡核苷酸选自由以下项组成的组:

[0555] 5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$A$_s$G$_s$^{m}C$_s$g$_s$a$_s$a$_s$g$_s$t$_s$g$_s$c$_s$a$_s$c$_s$a$_s$^{m}C$_s$G$_s$G-3' SEQ ID NO:20

[0556] 5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$G$_s$A$_s$A$_s$g$_s$t$_s$g$_s$c$_s$a$_s$c$_s$a$_s$^{m}c$_s$G$_s$G-3' SEQ ID NO:21

[0557] 5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$G$_s$A$_s$A$_s$g$_s$t$_s$g$_s$c$_s$a$_s$c$_s$a$_s$^{m}C$_s$G$_s$G-3' SEQ ID NO:21

[0558] 5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$G$_s$^{m}C$_s$G$_s$a$_s$a$_s$g$_s$t$_s$g$_s$c$_s$a$_s$c$_s$a$_s$^{m}C$_s$G$_s$G-3' SEQ ID NO:22

[0559] 5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$A$_s$G$_s$^{m}C$_s$g$_s$a$_s$a$_s$g$_s$t$_s$g$_s$c$_s$a$_s$c$_s$A$_s$^{m}C$_s$G-3' SEQ ID NO:23

[0560] 5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$^{m}C$_s$G$_s$A$_s$a$_s$g$_s$t$_s$g$_s$c$_s$a$_s$c$_s$a$_s$^{m}C$_s$G-3' SEQ ID NO:24

[0561] 5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$A$_s$G$_s$G$_s$t$_s$g$_s$a$_s$a$_s$g$_s$^{m}c$_s$g$_s$a$_s$a$_s$g$_s$T$_s$G$_s$^{m}C-3' SEQ ID NO:25

[0562] 5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$A$_s$G$_s$g$_s$t$_s$g$_s$a$_s$a$_s$g$_s$^{m}c$_s$g$_s$a$_s$A$_s$G$_s$T$_s$G-3' SEQ ID NO:26

[0563] 5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$A$_s$G$_s$G$_s$t$_s$g$_s$a$_s$a$_s$g$_s$^{m}c$_s$g$_s$a$_s$a$_s$G$_s$T$_s$G-3' SEQ ID NO:26;和

[0564] 5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$A$_s$G$_s$G$_s$t$_s$g$_s$a$_s$a$_s$g$_s$^{m}c$_s$g$_s$a$_s$A$_s$G$_s$T-3' SEQ ID NO:27

[0565] 其中大写字母表示β-D-氧基-LNA单元;小写字母表示DNA单元;下标"o"表示磷酸二酯键;下标"s"表示硫代磷酸酯键;上标m表示含有5-甲基胞嘧啶碱基的DNA或β-D-氧基-LNA单元;GN2-C6表示具有C6接头的GalNAc2缀合物。

[0566] 在一个实施方案中,其中GalNAc缀合的反义寡核苷酸选自由以下项组成的组:

[0567] 5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$A$_s$G$_s$G$_s$t$_s$g$_s$a$_s$a$_s$g$_s$^{m}c$_s$g$_s$a$_s$a$_s$g$_s$T$_s$G$_s$^{m}C-3' SEQ ID NO:25

[0568] 5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$A$_s$G$_s$g$_s$t$_s$g$_s$a$_s$a$_s$g$_s$^{m}c$_s$g$_s$a$_s$A$_s$G$_s$T$_s$G-3' SEQ ID NO:26

[0569] 5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$A$_s$G$_s$G$_s$t$_s$g$_s$a$_s$a$_s$g$_s$^{m}c$_s$g$_s$a$_s$a$_s$G$_s$T$_s$G-3' SEQ ID NO:26;和

[0570] 5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$A$_s$G$_s$G$_s$t$_s$g$_s$a$_s$a$_s$g$_s$^{m}c$_s$g$_s$a$_s$A$_s$G$_s$T-3' SEQ ID NO:27

[0571] 其中大写字母表示β-D-氧基-LNA单元;小写字母表示DNA单元;下标"o"表示磷酸二酯键;下标"s"表示硫代磷酸酯键;上标m表示含有5-甲基胞嘧啶碱基的DNA或β-D-氧基-LNA单元;GN2-C6表示具有C6接头的GalNAc2缀合物。

[0572] 在一个实施方案中,其中GalNAc缀合的反义寡核苷酸选自由以下项组成的组:

[0573] 5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$G$_s$^{m}C$_s$G$_s$t$_s$a$_s$a$_s$a$_s$g$_s$a$_s$g$_s$a$_s$G$_s$G-3' SEQ ID NO:15

[0574] 5’-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$G$_s$^{m}C$_s$G$_s$t$_s$a$_s$a$_s$a$_s$g$_s$a$_s$g$_s$A$_s$G$_s$G-3’ SEQ ID NO:15

[0575] 5’-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$G$_s$^{m}C$_s$G$_s$t$_s$a$_s$a$_s$a$_s$g$_s$a$_s$g$_s$a$_s$G$_s$G$_s$T-3’ SEQ ID NO:16

[0576] 5’-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$A$_s$G$_s$^{m}C$_s$g$_s$a$_s$a$_s$g$_s$t$_s$g$_s$c$_s$a$_s$c$_s$a$_s$^{m}C$_s$G$_s$G-3’ SEQ ID NO:20

[0577] 5’-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$A$_s$G$_s$^{m}C$_s$g$_s$a$_s$a$_s$g$_s$t$_s$g$_s$c$_s$a$_s$c$_s$A$_s$^{m}C$_s$G-3’ SEQ ID NO:23;和

[0578] 5’-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$A$_s$G$_s$g$_s$t$_s$g$_s$a$_s$a$_s$g$_s$^{m}c$_s$g$_s$a$_s$A$_s$G$_s$T$_s$G-3’ SEQ ID NO:26

[0579] 其中大写字母表示β-D-氧基-LNA单元;小写字母表示DNA单元;下标“o”表示磷酸二酯键;下标“s”表示硫代磷酸酯键;上标m表示含有5-甲基胞嘧啶碱基的DNA或β-D-氧基-LNA单元;GN2-C6表示具有C6接头的GalNAc2缀合物。

[0580] 在下表2中,显示了在5端中具有可生物裂解的CA接头(如果存在)的反义寡核苷酸序列,以及靶向SEQ ID NO:1的第1530位至第1602位的GalNAc缀合的反义寡核苷酸。

[0581] 表2:本发明的GalNAc缀合的反义寡核苷酸用单独的化合物识别号(CMP ID NO)识别。

[0582]

SEQ ID NO	反义寡核苷酸序列	化合物	CMP ID NO
15	cagcgtaaagagagg	5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$**G$_s$^{m}C$_s$G$_s$**t$_s$a$_s$a$_s$a$_s$g$_s$a$_s$g$_s$a$_s$**G$_s$G**-3'	15_1 图 5
		5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$**G$_s$^{m}C$_s$G$_s$**t$_s$a$_s$a$_s$a$_s$g$_s$a$_s$g$_s$**A$_s$G$_s$G**-3'	15_2 图 6
16	cagcgtaaagagaggt	5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$**G$_s$^{m}C$_s$G$_s$**t$_s$a$_s$a$_s$a$_s$g$_s$a$_s$g$_s$a$_s$**G$_s$G$_s$T**-3'	16_1 图 4
17	cacgcgtaaagagaggt	5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$**^{m}C$_s$G$_s$^{m}C$_s$**g$_s$t$_s$a$_s$a$_s$a$_s$g$_s$a$_s$g$_s$a$_s$**G$_s$G$_s$T**-3'	17_1
18	caagaaggcacagacgg	5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$**A$_s$G$_s$A$_s$**a$_s$g$_s$g$_s$c$_s$a$_s$c$_s$a$_s$g$_s$a$_s$**^{m}C$_s$G$_s$G**-3'	18_1
19	cagagaaggcacagacgg	5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$**G$_s$A$_s$G$_s$**a$_s$a$_s$g$_s$g$_s$c$_s$a$_s$c$_s$a$_s$g$_s$a$_s$**^{m}C$_s$G$_s$G**-3'	19_1
20	caagcgaagtgcacacgg	5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$**A$_s$G$_s$^{m}C$_s$**g$_s$a$_s$a$_s$g$_s$t$_s$g$_s$c$_s$a$_s$c$_s$a$_s$**^{m}C$_s$G$_s$G**-3'	20_1 图 8
21	cagaagtgcacacgg	5'- GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$**G$_s$A$_s$A$_s$**g$_s$t$_s$g$_s$c$_s$a$_s$c$_s$a$_s$^{m}**c$_s$G$_s$G**-3'	21_1
		5’-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$**G$_s$A$_s$A$_s$**g$_s$t$_s$g$_s$c$_s$a$_s$c$_s$a$_s$**^{m}C$_s$G$_s$G**-3’	21_2
22	cagcgaagtgcacacgg	5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$**G$_s$^{m}C$_s$G$_s$**a$_s$a$_s$g$_s$t$_s$g$_s$c$_s$a$_s$c$_s$a$_s$**^{m}C$_s$G$_s$G**-3'	22_1
23	caagcgaagtgcacacg	5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$**A$_s$G$_s$^{m}C$_s$**g$_s$a$_s$a$_s$g$_s$t$_s$g$_s$c$_s$a$_s$c$_s$**A$_s$^{m}C$_s$G**-3'	23_1 图 3
24	cacgaagtgcacacg	5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$**^{m}C$_s$G$_s$A$_s$**a$_s$g$_s$t$_s$g$_s$c$_s$a$_s$c$_s$a$_s$**^{m}C$_s$G**-3'	24_1

[0583]

25	caaggtgaagcgaagtgc	5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$**A$_S$G$_S$G$_S$**t$_S$g$_S$a$_S$a$_S$g$_S$^{m}c$_S$g$_S$a$_S$a$_S$g$_S$**T$_S$G$_S$^{m}C**-3'	25_1
26	caaggtgaagcgaagtg	5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$**A$_S$G$_S$**g$_S$t$_S$g$_S$a$_S$a$_S$g$_S$^{m}c$_S$g$_S$a$_S$**A$_S$G$_S$T$_S$G**-3'	26_1 图 7
		5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$**A$_S$G$_S$G$_S$**t$_S$g$_S$a$_S$a$_S$g$_S$^{m}c$_S$g$_S$a$_S$a$_S$**G$_S$T$_S$G**-3'	26_2
27	caaggtgaagcgaagt	5'-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$**A$_S$G$_S$G$_S$**t$_S$g$_S$a$_S$a$_S$g$_S$^{m}c$_S$g$_S$a$_S$**A$_S$G$_S$T**-3'	27_1
29	gcagaggtgaagcgaagtgc	5'-Fig1J-$_o$G$_S$C$_S$A$_S$G$_S$A$_S$g$_S$g$_S$t$_S$g$_S$a$_S$a$_S$g$_S$c$_S$g$_S$a$_S$A$_S$G$_S$T$_S$G$_S$C-3'	29_1 图 2

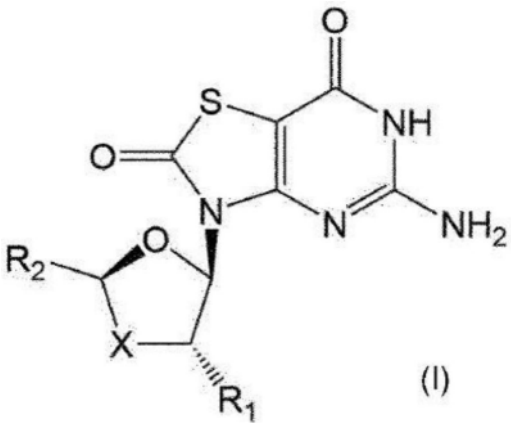
[0584] 其中大写粗体字母表示β-D-氧基-LNA单元;大写的带下划线的字母表示MOE,小写字母表示DNA单元;下标“o”表示磷酸二酯键;下标“s”表示硫代磷酸酯键;上标m表示含有5-甲基胞嘧啶碱基的DNA或β-D-氧基-LNA单元;GN2-C6表示具有C6接头的GalNAc2缀合物(图1D)。化合物15_至27_1都描述于WO2015/173208中,并且化合物29_1描述于WO2014/179627中,一些化合物也在如表2所指示的附图中呈现。

[0585] 8.TLR7激动剂

[0586] 本发明的TLR7激动剂为具有Toll样受体激动活性的3-取代的5-氨基-6H-噻唑并[4,5-d]嘧啶-2,7-二酮化合物以及其前药。WO 2006/066080、WO 2016/055553和WO 2016/091698描述了此类TLR7激动剂及其前药及其制备(通过引用并入本文)。

[0587] 在本发明的一个方面,本发明的药物组合中的TLR7激动剂由式(I)表示:

[0588]



(I)

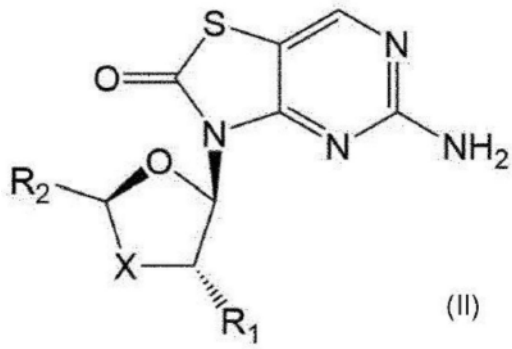
[0589] 其中X为CH_2或S;

[0590] R_1为-OH或-H,并且

[0591] R_2为1-羟基丙基或羟基甲基;

[0592] 或式(II):

[0593]



(II)

[0594] 其中X为CH_2或S；

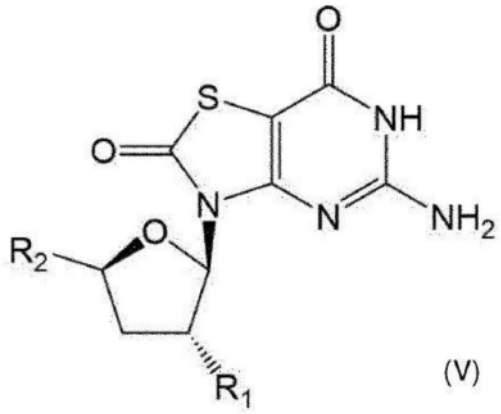
[0595] R_1为-OH或-H或乙酰氧基，并且

[0596] R_2为1-乙酰氧基丙基或1-羟基丙基或1-羟基甲基或乙酰氧基(环丙基)甲基或乙酰氧基(丙炔-1-基)甲基，

[0597] 或其药用盐、对映体或非对映体。

[0598] 式(I)的化合物为活性TLR7激动剂。

[0599] 在本发明的一个实施方案中，式(I)的活性TLR7激动剂的子集由式(V)表示：

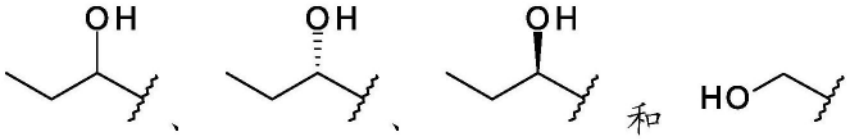
[0600] 

(V)

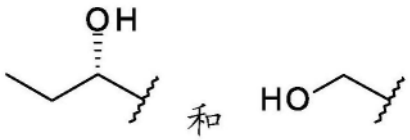
[0601] 其中R_1为-OH，并且R_2为1-羟基丙基或羟基甲基，

[0602] 或其药用盐、对映体或非对映体。

[0603] 在本发明的一个实施方案中，式(I)或式(V)中的R_2处的取代基选自：

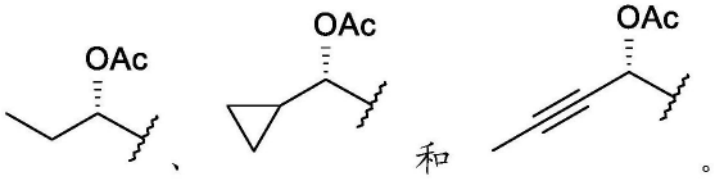
[0604] 

[0605] 式(II)的化合物为TLR7激动剂前药。在一个实施方案中，前药为在R_2处具有选自以下项的取代基的单一前药：

[0606] 

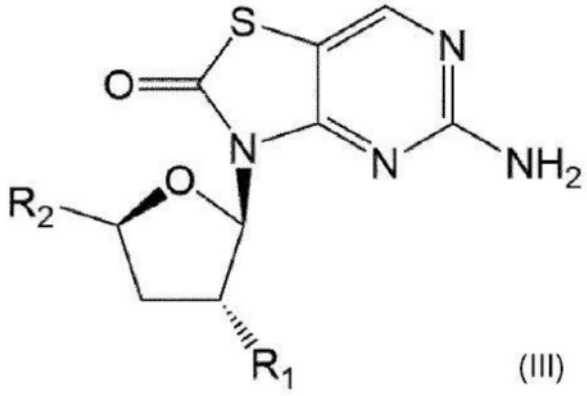
。

[0607] 在另一个实施方案中，前药为在R_2处具有选自以下项的取代基的双前药：

[0608] 

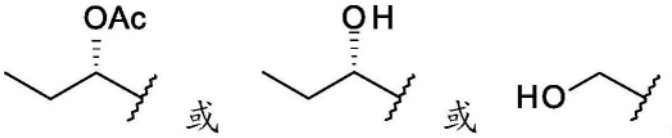
。

[0609] 式(II)的TLR7激动剂前药的子集由式(III)表示：

[0610] 

(III)

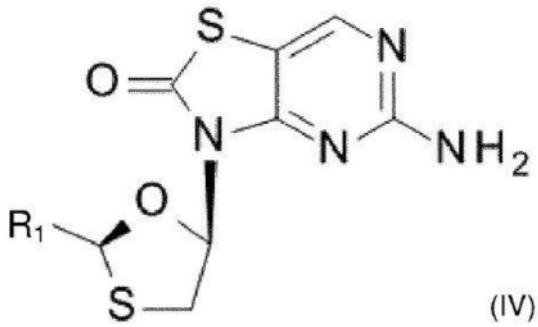
[0611] 其中R_1为-OH或乙酰氧基，并且R_2为1-乙酰氧基丙基或1-羟基丙基或1-羟基甲基或



。

[0612] 或其药用盐、对映体或非对映体；

[0613] 或式(IV)：

[0614] 

(IV)

[0615] 其中R_1为乙酰氧基(环丙基)甲基或乙酰氧基(丙炔-1-基)甲基或

[0616] 

，

[0617] 或其药用盐、对映体或非对映体。

[0618] 式(IV)的化合物为与式(III)的化合物一样的双前药，其中R_1为OH，并且R_2为1-乙酰氧基丙基。式(III)的化合物，其中R_1为乙酰氧基，并且R_2为三元前药。

[0619] 施用之后，式(II)、式(III)或式(IV)的化合物被代谢成它们的活性形式，这些活性形式是有用的TLR7激动剂。

[0620] 在一个实施方案中，用于本发明的药物组合中的TLR7激动剂选自由以下项组成的组：

[0621] [(1S)-1-[(2S,4R,5R)-5-(5-氨基-2-氧代-噻唑并[4,5-d]嘧啶-3-基)-4-羟基-四氢呋喃-2-基]丙基]乙酸酯(CMP ID NO:VI)；

[0622] 5-氨基-3-[(2R,3R,5S)-3-羟基-5-[(1S)-1-羟基丙基]四氢呋喃-2-基]-6H-噻唑并[4,5-d]嘧啶-2,7-二酮(CMP ID NO:VII)；

[0623] 5-氨基-3-[(2R,3R,5S)-3-羟基-5-[(1S)-1-羟基丙基]四氢呋喃-2-基]噻唑并

[4,5-d]嘧啶-2-酮(CMP ID NO:VIII)；

[0624] 5-氨基-3-(3'-脱氧-β-D-呋喃核糖基)-3H-噻唑并[4,5-d]嘧啶-2-酮(CMP ID NO:IX)；

[0625] 5-氨基-3-(2'-O-乙酰基-3'-脱氧-β-D-呋喃核糖基)-3H-噻唑并[4,5-d]嘧啶-2-酮(CMP ID NO:X)；

[0626] 5-氨基-3-(3'-脱氧-β-D-呋喃核糖基)-3H,6H-噻唑并[4,5-d]嘧啶-2,7-二酮(CMP ID NO:XI)；

[0627] [(S)-[(2S,5R)-5-(5-氨基-2-氧代-噻唑并[4,5-d]嘧啶-3-基)-1,3-氧杂硫杂环戊烷-2-基]-环丙基-甲基]乙酸酯(CMP ID NO:XII)；和

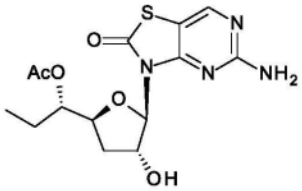
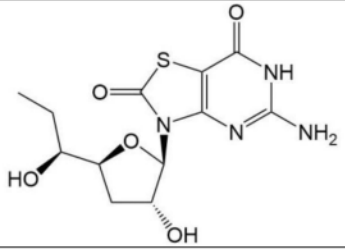
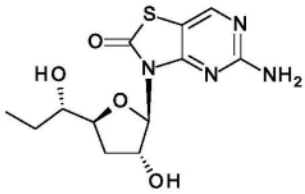
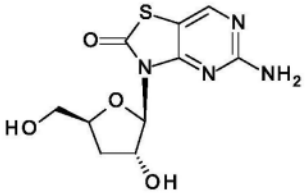
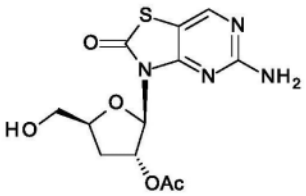
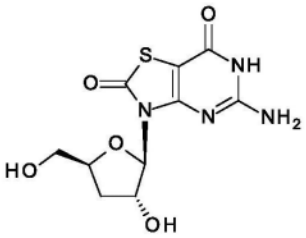
[0628] (1S)-1-[(2S,5R)-5-(5-氨基-2-氧代-噻唑并[4,5-d]嘧啶-3-基)-1,3-氧杂硫杂环戊烷-2-基]丁-2-炔基]乙酸酯(CMP ID NO:XIII)

[0629] 及其药用盐、对映体或非对映体。

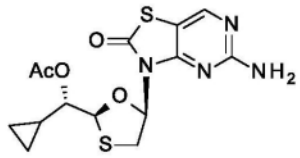
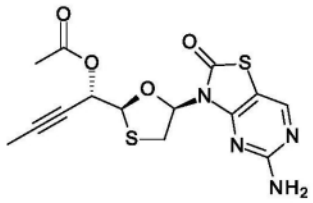
[0630] 表3列出了本发明中的TLR7激动剂，包括对描述它们的制备的文献的引用。

[0631] 表3：TLR7激动剂化合物用单独的化合物识别号(CMP ID NO)识别

[0632]

CMP ID NO	化合物名称	结构	参考文献
VI	[(1*S*)-1-[(2*S*,4*R*,5*R*)-5-(5-氨基-2-氧代-噻唑并[4,5-*d*]嘧啶-3-基)-4-羟基-四氢呋喃-2-基]丙基]乙酸酯		WO2016091698
VII	5-氨基-3-[(2R,3R,5S)-3-羟基-5-[(1S)-1-羟基丙基]四氢呋喃-2-基]-6H-噻唑并[4,5-d]嘧啶-2,7-二酮		WO2016091698
VIII	5-氨基-3-[(2R,3R,5S)-3-羟基-5-[(1S)-1-羟基丙基]四氢呋喃-2-基]噻唑并[4,5-d]嘧啶-2-酮		WO2016091698
IX	5-氨基-3-(3'-脱氧-β-D-呋喃核糖基)-3H-噻唑并[4,5-d]嘧啶-2-酮		WO2006066080
X	5-氨基-3-(2'-O-乙酰基-3'-脱氧-β-D-呋喃核糖基)-3H-噻唑并[4,5-d]嘧啶-2-酮		WO2006066080
XI	5-氨基-3-(3'-脱氧-β-D-呋喃核糖基)-3H,6H-噻唑并[4,5-d]嘧啶-2,7-二酮		WO2006066080

[0633]

CMP ID NO	化合物名称	结构	参考文献
XII	[(*S*)-[(2*S*,5*R*)-5-(5- 氨 基 -2-氧代-噻唑并[4,5-*d*]嘧啶-3-基)-1,3-氧杂硫杂环戊烷-2-基]-环丙基-甲基]乙酸酯		WO2016055553
XIII	(1S)-1-[(2S,5R)-5-(5- 氨 基 -2-氧代-噻唑并[4,5-d]嘧啶-3-基)-1,3-氧杂硫杂环戊烷-2-基]丁-2-炔基]乙酸酯		WO2016055553

[0634] 在一个特别优选的实施方案中,TLR7激动剂为CMP ID NO:VI。

[0635] 9.药物组合物

[0636] 在进一步的方面,本发明提供了药物组合物,其包含任何前述治疗性寡核苷酸或TLR7激动剂或其盐以及药用稀释剂、载体、盐和/或佐剂。在一个实施方案中,本发明的药物组合中的治疗性寡核苷酸和TLR7激动剂以单独的组合物施用。在一个实施方案中,治疗性寡核苷酸被配制在磷酸盐缓冲盐水中用于皮下施用,并且TLR7激动剂被配制为片剂用于口服施用。

[0637] 本发明的药物组合中的治疗性寡核苷酸可与药用活性或惰性物质混合以制备药物组合物或制剂。药物组合物的组成和配制方法取决于许多标准,包括但不限于施用途径、疾病程度或施用剂量。治疗性寡核苷酸的药用稀释剂包括磷酸盐缓冲盐水(PBS),并且药用盐包括但不限于钠盐和钾盐。在一些实施方案中,治疗性寡核苷酸的药用稀释剂为无菌磷酸盐缓冲盐水。在一些实施方案中,寡核苷酸以50mg/ml至150mg/ml溶液的浓度用于药用稀释剂中。治疗性寡核苷酸或包含治疗性寡核苷酸的药物组合物通过胃肠外途径施用,包括静脉内、动脉内、皮下或肌肉内注射或输注。在一个实施方案中,寡核苷酸缀合物是静脉内施用的。对于治疗性寡核苷酸,有利的情况是皮下施用。在一些实施方案中,本发明的寡核苷酸缀合物或药物组合物以0.5mg/kg至6.0mg/kg,诸如0.75mg/kg至5.0mg/kg,诸如1.0mg/kg至4mg/kg的剂量施用。施用可以为每周一次、每2周一次(两周一次)、每三周一次、每月一次或更长的间隔。

[0638] 对于本发明的药物组合中的TLR7激动剂,药学有效量的本发明的化合物通过肠内施用(诸如口服或通过胃肠道)。本发明中的TLR7激动剂化合物可以任何方便的施用形式的单位剂量施用,例如,片剂、粉剂、胶囊剂、溶液剂、分散剂、混悬剂、糖浆剂、喷雾剂、栓剂、凝胶剂、乳剂。特别是可使用口服单位剂型,诸如片剂和胶囊剂。在一个实例中,本发明的TLR7激动剂化合物的药学有效量将在约75mg至250mg的范围内,诸如100mg至200mg,诸如150mg

pr.至170mg pr.剂量。施用可以为每天一次、隔日一次(QOD)或每周一次(QW)。

[0639] 合适的载体和赋形剂是本领域技术人员熟知的,并且在例如Ansel,Howard C.等人,Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems.Philadelphia:Lippincott,Williams和Wilkins,2004;Gennaro,Alfonso R.等人Remington:The Science and Practice of Pharmacy.Philadelphia:Lippincott,Williams&Wilkins,2000;以及Rowe,Raymond C.Handbook of Pharmaceutical Excipients.Chicago,Pharmaceutical Press,2005中有详细描述。

[0640] 这些组合物可以通过常规的灭菌技术进行灭菌,或者可以进行无菌过滤。所得的水溶液可以包装后直接使用或冻干,在施用前将冻干的制剂与无菌水性运载体混合。制剂的pH通常为介于3至11之间,更优选地介于5和9之间或介于6和8之间,并且最优选地介于7和8之间,诸如7至7.5。可以将固体形式的所得组合物包装在多个单剂量单元中,每一个单元包含固定量的一种或多种上述试剂,诸如在片剂或胶囊的密封包装中。

[0641] 10.治疗性寡核苷酸的制剂

[0642] 已经开发了各种制剂以促进治疗性寡核苷酸的使用,其可适用于本发明的药物组合中使用的治疗性寡核苷酸。例如,可使用这样的制剂将寡核苷酸递送至受试者或细胞环境,该制剂使降解最小化、促进递送和/或摄取或者为该制剂中的寡核苷酸提供另一种有益特性。在一些实施方案中,本文提供了包含第一药物的药物组合,该第一药物是包含寡核苷酸(例如,单链或双链寡核苷酸)以减少HBV抗原(例如,HBsAg)的表达的组合物。此类组合物可合适地配制,使得当施用于受试者时,无论是进入靶细胞的直接环境中还是全身性地,充足部分的寡核苷酸进入细胞以减少HBV抗原表达。各种合适的寡核苷酸制剂中的任一种寡核苷酸制剂可用于递送寡核苷酸以减少如本文所公开的HBV抗原。在一些实施方案中,本发明的药物组合的寡核苷酸被配制在缓冲溶液中,诸如磷酸盐缓冲盐溶液、脂质体、胶束结构和衣壳。

[0643] 寡核苷酸与阳离子脂质的制剂可用于促进寡核苷酸转染到细胞中。例如,可使用阳离子脂质(例如lipofectin)、阳离子甘油衍生物和聚阳离子分子(例如,聚赖氨酸)。合适的脂质包括Oligofectamine、Lipofectamine(Life Technologies)、NC388(Ribozyme Pharmaceuticals,Inc.,Boulder,Colo.)或FuGene 6(罗氏),所有这些都可根据制造商的说明使用。

[0644] 因此,在一些实施方案中,寡核苷酸制剂包含脂质纳米颗粒。在一些实施方案中,赋形剂包含脂质体、脂质、脂质复合物、微球、微粒、纳米球或纳米颗粒,或者可被配制用于向有需要的受试者的细胞、组织、器官或身体施用(参见,例如,Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第22版,Pharmaceutical Press,2013)。

[0645] 在一些实施方案中,本文公开的制剂包含赋形剂。在一些实施方案中,赋形剂赋予组合物活性成分改善的稳定性、改善的吸收性、改善的溶解度和/或治疗性增强。在一些实施方案中,赋形剂为缓冲剂(例如,柠檬酸钠、磷酸钠、三碱(tris base)或氢氧化钠)或媒介物(例如,缓冲溶液、凡士林、二甲基亚砜或矿物油)。在一些实施方案中,将寡核苷酸冻干以延长其保存期限,然后在使用前(例如,施用于受试者)制成溶液。因此,包含本文所述的寡核苷酸中的任一种寡核苷酸的组合物中的赋形剂可以为冻干保护剂(例如,甘露醇、乳糖、聚乙二醇或聚乙烯吡咯烷酮)或崩解温度调节剂(例如,葡聚糖、ficoll或明胶)。

[0646] 在本发明的药物组合的一些实施方案中，将包含寡核苷酸的组合物配制成与其预期的施用途径相容。施用途径的实例包括肠胃外(例如，静脉内、皮内、皮下)、口服(例如，吸入)、透皮(局部)、透粘膜和直肠施用。在本发明的药物组合中的寡核苷酸为RNAi寡核苷酸的情况下，用于皮下的制剂是特别有利的。

[0647] 适用于可注射用途的药物组合物包含无菌水溶液(在水溶性的情况下)或分散剂和用于临时制备无菌可注射溶液或分散剂的无菌粉剂。合适的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL.TM.(BASF,Parsippany,N.J.)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。载体可以为水或溶剂或分散介质。溶剂或分散介质可包含例如水、乙醇、多元醇(例如，甘油、丙二醇和液态聚乙二醇等)及其合适的混合物。在许多情况下，将优选的是，在组合物中包含等渗剂，例如糖、多元醇(诸如甘露醇、山梨糖醇)和氯化钠。无菌可注射溶液可通过以下方式来制备：将所需量的寡核苷酸与上面列举的成分中的一种成分或上面列举的成分的组合一起(根据需要)掺入选定的溶剂中，随后进行过滤灭菌。

[0648] 在本发明的药物组合的一些实施方案中，组合中的组合物可包含至少约0.1％或更多的治疗剂(例如，用于减少HBV抗原表达的寡核苷酸)，尽管活性成分的百分比可占总组合物重量或体积的约1％至约80％或更多之间。制备此类药物制剂的领域的技术人员将考虑诸如溶解度、生物利用度、生物学半衰期、施用途径、产品保质期等因素以及其他药理学考虑，并且因此各种剂量和治疗方案可以是期望的。

[0649] 虽然许多实施方案涉及本文公开的寡核苷酸中的任何寡核苷酸的肝靶向递送，但也可考虑靶向其他组织。

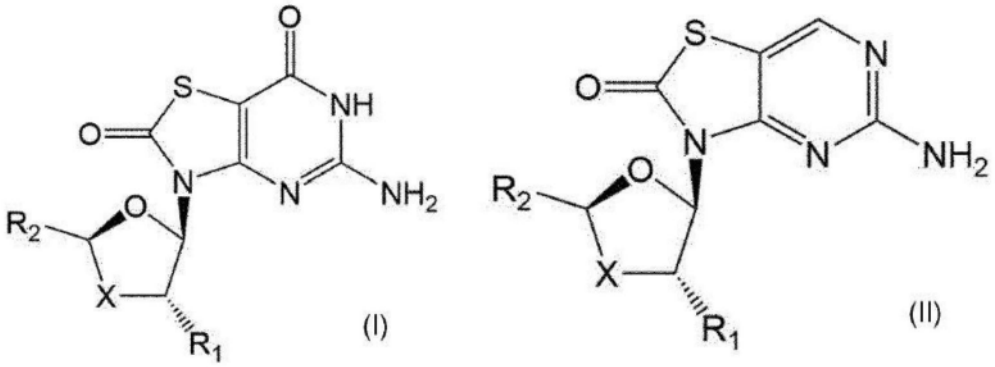
[0650] 11.药物组合和组分试剂盒

[0651] 本发明的一个方面涉及一种药物组合，即如本文所述的靶向HBV的治疗性寡核苷酸和TLR7激动剂，其各自配制在药用载体中。

[0652] 本发明的药物组合可用于比单独包含的治疗性寡核苷酸或TLR7激动剂更有效地治疗HBV感染。在一个实施方案中，本发明的药物组合可用于更快速地抑制HBV、以增加的持续时间抑制HBV和/或以比单独包含的治疗性寡核苷酸或TLR7激动剂更大的效果抑制HBV。这些作用可通过HBsAg滴度的降低来衡量。在一个实施方案中，本发明的药物组合比单独包含的治疗性寡核苷酸或TLR7激动剂更快速地引起HBsAg滴度的降低。在一个实施方案中，本发明的药物组合引起比单独包含的治疗性寡核苷酸或TLR7激动剂更长时间的HBsAg滴度降低。在一个实施方案中，本发明的药物组合比单独包含的治疗性寡核苷酸或TLR7激动剂更大程度地引起HBsAg滴度的降低。

[0653] 在本发明的一个优选实施方案中，药物组合包含如本文所述的RNAi寡核苷酸和TLR7激动剂或由其组成。

[0654] 在本发明的一个实施方案中，药物组合包含式(I)或式(II)的RNAi寡核苷酸和TLR7激动剂或由其组成。

[0655] 

[0656] 其中X为CH_2或S；

[0657] 对于式(I)，R_1为-OH或-H，并且R_2为1-羟基丙基或羟基甲基，

[0658] 对于式(II)，R_1为-OH或-H或乙酰氧基，并且R_2为1-乙酰氧基丙基或1-羟基丙基或1-羟基甲基或乙酰氧基(环丙基)甲基或乙酰氧基(丙炔-1-基)甲基，

[0659] 或其药用盐、对映体或非对映体。

[0660] 本发明的RNAi寡核苷酸和TLR7激动剂已在上文单独描述，例如在上文第1-3节以及第8节中。

[0661] 在本发明的一个实施方案中，药物组合可选自表4中竖列中的化合物和横列中的化合物。每个可能的组合都用“x”表示。

[0662] 表4：可能的RNAi寡核苷酸、TLR7激动剂组合

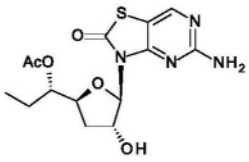
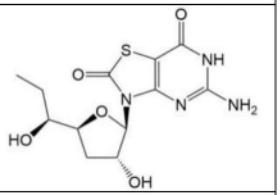
[0663]

		TLR7 激动剂 CMP ID NO							
		VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
RNAi ID NO	1	x	x	x	x	x	x	x	x
	2	x	x	x	x	x	x	x	x
	3	x	x	x	x	x	x	x	x
	4	x	x	x	x	x	x	x	x
	5	x	x	x	x	x	x	x	x
	6	x	x	x	x	x	x	x	x
	7	x	x	x	x	x	x	x	x
	8	x	x	x	x	x	x	x	x
	9	x	x	x	x	x	x	x	x

[0664] 下面的表5和表6显示了RNAi寡核苷酸(竖)和TLR7激动剂(横)的选定组合。

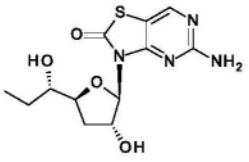
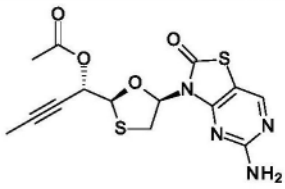
[0665] 表5

[0666]

		TLR7 激动剂 CMP ID NO	
		VI	VII
			
RNAi ID NO	1	x	x
	2	x	x
	3	x	x
	4	x	x
	5	x	x
	6	x	x
	7	x	x
	8	x	x
	9	x	x

[0667] 表6

[0668]

		TLR7 激动剂 CMP ID NO	
		VIII	XIII
			
RNAi ID NO	1	x	x
	2	x	x
	3	x	x
	4	x	x
	5	x	x
	6	x	x

[0669]

	7	x	x
	8	x	x
	9	x	x

[0670] 在本发明的一个实施方案中,药物组合选自由以下项组成的组:

[0671] RNAi ID NO:1和CMP ID NO:VI;RNAi ID NO:2和CMP ID NO:VI;RNAi ID NO:3和CMP ID NO:VI;RNAi ID NO:4和CMP ID NO:VI;RNAi ID NO:5和CMP ID NO:VI;RNAi ID NO:6和CMP ID NO:VI;RNAi ID NO:7和CMP ID NO:VI;RNAi ID NO:8和CMP ID NO:VI;RNAi ID NO:9和CMP ID NO:VI;

[0672] RNAi ID NO:1和CMP ID NO:VII;RNAi ID NO:2和CMP ID NO:VII;RNAi ID NO:3和CMP ID NO:VII;RNAi ID NO:4和CMP ID NO:VII;RNAi ID NO:5和CMP ID NO:VII;RNAi ID NO:6和CMP ID NO:VII;RNAi ID NO:7和CMP ID NO:VII;RNAi ID NO:8和CMP ID NO:VII;RNAi ID NO:9和CMP ID NO:VII;

[0673] RNAi ID NO:1和CMP ID NO:VIII;RNAi ID NO:2和CMP ID NO:VIII;RNAi ID NO:

3和CMP ID NO:VIII;RNAi ID NO:4和CMP ID NO:VIII;RNAi ID NO:5和CMP ID NO:VIII;RNAi ID NO:6和CMP ID NO:VIII;RNAi ID NO:7和CMP ID NO:VIII;RNAi ID NO:8和CMP ID NO:VIII;RNAi ID NO:9和CMP ID NO:VIII;

[0674] RNAi ID NO:1和CMP ID NO:XIII;RNAi ID NO:2和CMP ID NO:XIII;RNAi ID NO:3和CMP ID NO:XIII;RNAi ID NO:4和CMP ID NO:XIII;RNAi ID NO:5和CMP ID NO:XIII;RNAi ID NO:6和CMP ID NO:XIII;RNAi ID NO:7和CMP ID NO:XIII;RNAi ID NO:8和CMP ID NO:XIII;RNAi ID NO:9和CMP ID NO:XIII;

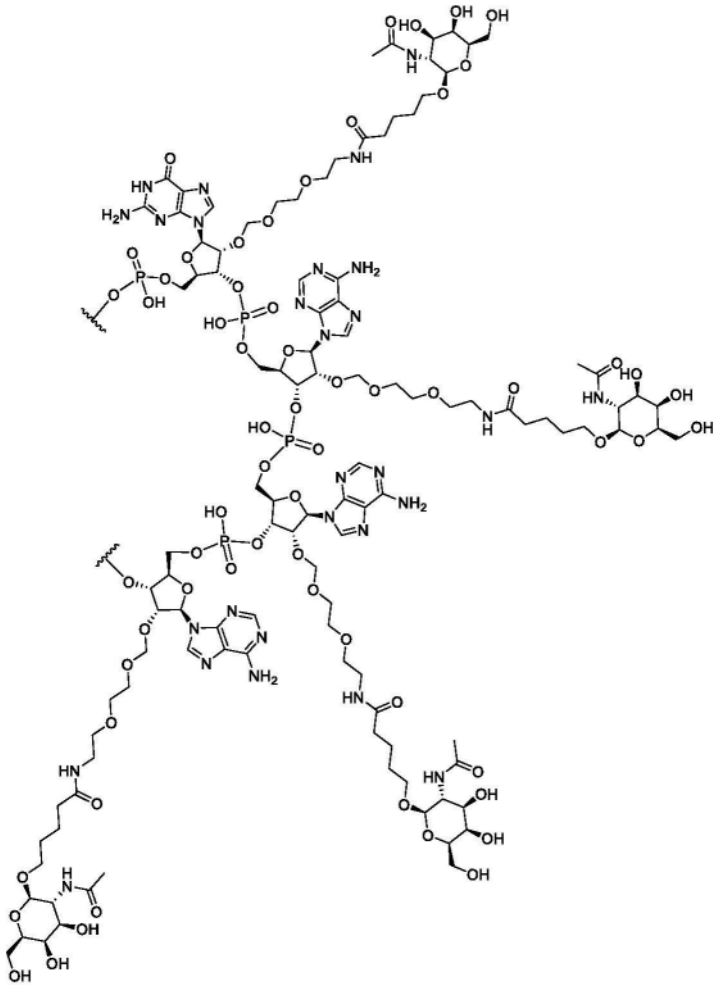
[0675] 或其药用盐、对映体或非对映体。

[0676] 在一个实施方案中,本发明的药物组合的治疗性寡核苷酸由RNAi寡核苷酸组成,其为RNAi ID NO:7:

[0677] 用于减少乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)mRNA的表达的寡核苷酸,该寡核苷酸包含与反义链形成双链体区的正义链,其中:

[0678] 所述正义链包含如GACAAAAAUCCUCACAAUAAGCAGCCGAAAGGCUGC(SEQ ID NO:41)所示的序列,并且包含:在第3位、第8位至第10位、第12位、第13位和第17位处的2'-氟修饰的核苷酸;在第1位、第2位、第4位至第7位、第11位、第14位至第16位、第18位至第26位和第31位至第36位处的2'-O-甲基修饰的核苷酸;以及在第1位和第2位处的核苷酸之间的一个硫代磷酸酯核苷酸间键,其中所述正义链上的所述-GAAA-序列的所述核苷酸中的每个核苷酸缀合至单价GalNac部分,其中所述-GAAA-序列包含以下结构:

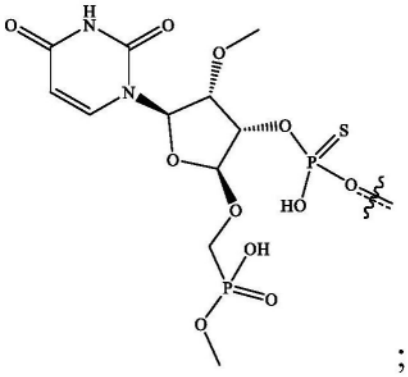
[0679]



;

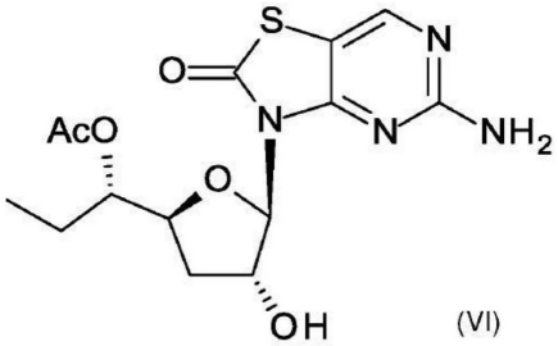
并且

[0680] 所述反义链包含如UUAUUGUGAGGAUUUUUGUCGG(SEQ ID NO:38)所示的序列,并且包含:在第2位、第3位、第5位、第7位、第8位、第10位、第12位、第14位、第16位和第19位处的2'-氟修饰的核苷酸;在第1位、第4位、第6位、第9位、第11位、第13位、第15位、第17位、第18位和第20位至第22位处的2'-O-甲基修饰的核苷酸;以及核苷酸1与核苷酸2之间、核苷酸2与核苷酸3之间、核苷酸3与核苷酸4之间、核苷酸20与核苷酸21之间以及核苷酸21与核苷酸22之间的五个硫代磷酸酯核苷酸间键,其中所述反义链的5'-核苷酸的糖的4'-碳具有以下结构:

[0681] 

;

[0682] 并且TLR7激动剂为CMP ID NO:VI:

[0683] 

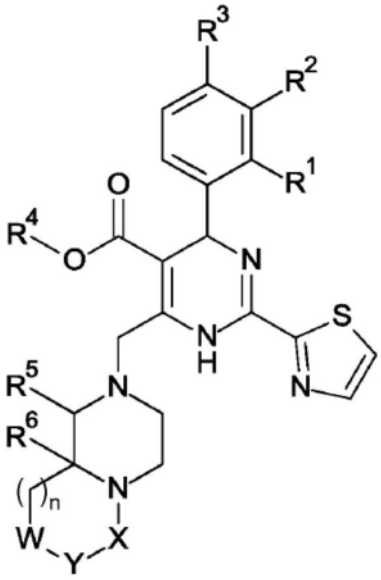
(VI)

[0684] 或其药用盐、对映体或非对映体。

[0685] 在包含RNAi寡核苷酸和TLR7激动剂的药物组合的特别优选的实施方案中,TLR7激动剂为CMP ID NO:VI。

[0686] 在一个实施方案中,本发明的包含RNAi寡核苷酸和TLR7激动剂的药物组合进一步包含CpAM(核心蛋白变构调节剂)。

[0687] 在一个优选的实施方案中,CpAM是根据化合物(CpAM1)。化合物(CpAM1)是用于通过靶向HBV衣壳来治疗和/或预防人类的HBV的CpAM,其公开于WO2015132276中。化合物(CpAM1)的结构显示如下:

[0688] 

化合物 (CpAM1)

[0689] 其中

[0690] R^1为氢、卤素或C_{1-6}烷基；

[0691] R^2为氢或卤素；

[0692] R^3为氢或卤素；

[0693] R^4为C_{1-6}烷基；

[0694] R^5为氢、羟基C_{1-6}烷基、氨基羰基、C_{1-6}烷氧基羰基或羧基；

[0695] R^6为氢、C_{1-6}烷氧基羰基或羧基-C_mH_{2m}-，

[0696] X为羰基或磺酰基；

[0697] Y为-CH_2-、-O-或-N(R^7)-，

[0698] 其中R^7为氢、C_{1-6}烷基、卤代C_{1-6}烷基、C_{3-7}环烷基-C_mH_{2m}-、C_{1-6}烷氧基羰基-C_mH_{2m}-、-C_tH_{2t}-COOH、-卤代C_{1-6}烷基-COOH、-(C_{1-6}烷氧基)C_{1-6}烷基-COOH、-C_{1-6}烷基-O-C_{1-6}烷基-COOH、-C_{3-7}环烷基-C_mH_{2m}-COOH、-C_mH_{2m}-C_{3-7}环烷基-COOH、羟基-C_tH_{2t}-、羧基螺[3.3]庚基或羧基苯基-C_mH_{2m}-、羧基吡啶基-C_mH_{2m}-；

[0699] W为-CH_2-、-C(C_{1-6}烷基)$_2$-、-O-或羰基；

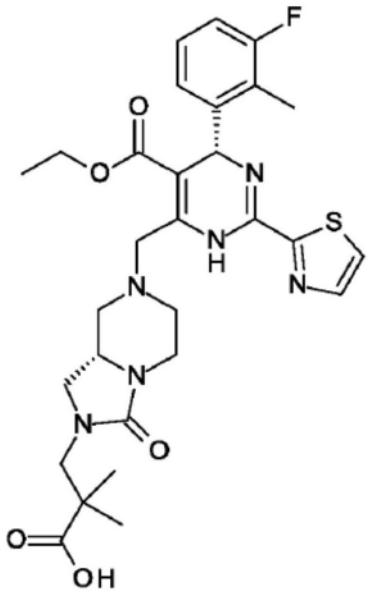
[0700] n为0或1；

[0701] m为0至7；

[0702] t为1至7；

[0703] 或其药用盐、或对映体、或非对映体。

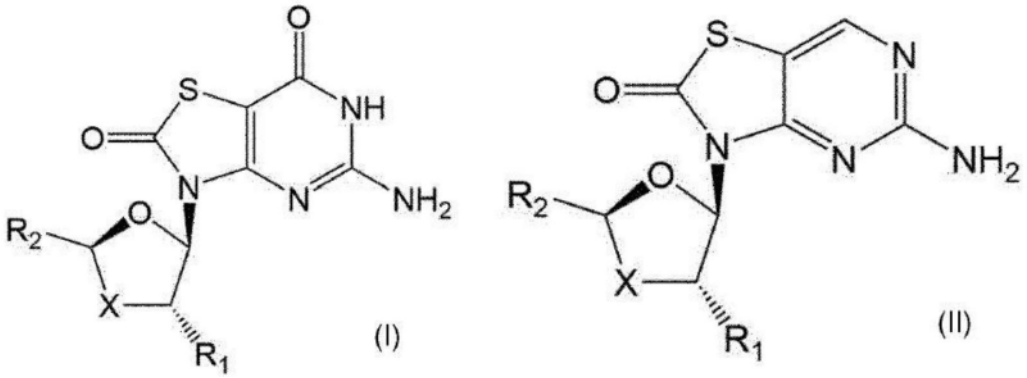
[0704] 在进一步优选的实施方案中，CpAM是根据化合物(CpAM2)或其药用盐、对映体或非对映体。化合物(CpAM2)是用于通过靶向HBV衣壳来治疗和/或预防人类的HBV的CpAM，其公开于WO2015132276的实例76中并且可以相应地进行制备。化合物(CpAM2)的结构显示如下：

[0705] 

化合物 (CpAM2)

[0706] 在进一步优选的实施方案中,CpAM为3-[(8aS)-7-[[(4S)-5-乙氧羰基-4-(3-氟-2-甲基-苯基)-2-噻唑-2-基-1,4-二氢嘧啶-6-基]甲基]-3-氧代-5,6,8,8a-四氢-1H-咪唑并[1,5-a]吡嗪-2-基]-2,2-二甲基丙酸,其公开于WO2015132276的实例76中并且可以相应地进行制备。

[0707] 在本发明的另一个实施方案中,药物组合包含以下项或由以下项组成:长度为13个至22个核苷酸的GalNAc缀合的反义寡核苷酸,其具有至少12个核苷酸的与SEQ ID NO:1的从第1530位至第1602位的连续序列100%互补的连续核苷酸序列;和式(I)或式(II)的TLR7激动剂:

[0708] 

[0709] 其中X为CH_2或S;

[0710] 对于式(I),R_1为-OH或-H,并且R_2为1-羟基丙基或羟基甲基,

[0711] 对于式(II),R_1为-OH或-H或乙酰氧基,并且R_2为1-乙酰氧基丙基或1-羟基丙基或1-羟基甲基或乙酰氧基(环丙基)甲基或乙酰氧基(丙炔-1-基)甲基,

[0712] 或其药用盐、对映体或非对映体。

[0713] 本发明的靶向HBV的GalNAc缀合的反义寡核苷酸和TLR7激动剂已在上文单独描述,例如在上文第4-6节以及第8节中。

[0714] 在本发明的一个实施方案中,药物组合可选自表7中竖列中的化合物和横列中的

化合物。每个可能的组合都用“x”表示。

[0715] 表7:可能的GalNAc缀合的反义寡核苷酸、TLR7激动剂组合

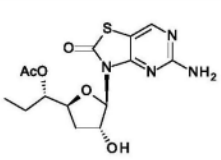
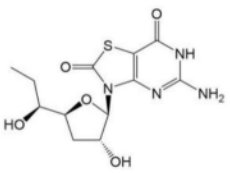
[0716]

CMP ID NO		TLR7 激动剂							
		VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
GalNAc 缀合的寡核苷酸	15_1	x	x	x	x	x	x	x	x
	15_2	x	x	x	x	x	x	x	x
	16_1	x	x	x	x	x	x	x	x
	17_1	x	x	x	x	x	x	x	x
	18_1	x	x	x	x	x	x	x	x
	19_1	x	x	x	x	x	x	x	x
	20_1	x	x	x	x	x	x	x	x
	21_1	x	x	x	x	x	x	x	x
	21_2	x	x	x	x	x	x	x	x
	22_1	x	x	x	x	x	x	x	x
	23_1	x	x	x	x	x	x	x	x
	24_1	x	x	x	x	x	x	x	x
	25_1	x	x	x	x	x	x	x	x
	26_1	x	x	x	x	x	x	x	x
	26_2	x	x	x	x	x	x	x	x
	27_1	x	x	x	x	x	x	x	x

[0717] 下面的表8和表9显示了GalNAc缀合的反义寡核苷酸(竖)和TLR7激动剂(横)的选定组合。

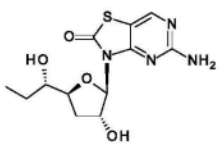
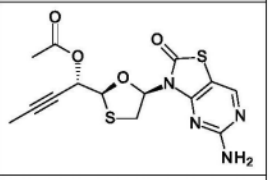
[0718] 表8

[0719]

CMP ID NO	化合物	VI	VII
			
15_1	GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$**G$_s$^{m}C$_s$G$_s$**t$_s$a$_s$a$_s$a$_s$g$_s$a$_s$g$_s$a$_s$**G$_s$G'**	x	x
15_2	GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$**G$_s$^{m}C$_s$G$_s$**t$_s$a$_s$a$_s$a$_s$g$_s$a$_s$g$_s$**A$_s$G$_s$G**	x	x
16_1	GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$**G$_s$^{m}C$_s$G$_s$**t$_s$a$_s$a$_s$a$_s$g$_s$a$_s$g$_s$a$_s$**G$_s$G$_s$T**	x	x
20_1	GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$**A$_s$G$_s$^{m}C$_s$**g$_s$a$_s$a$_s$g$_s$t$_s$g$_s$c$_s$a$_s$c$_s$a$_s$**^{m}C$_s$G$_s$G**	x	x
23_1	GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$**A$_s$G$_s$^{m}C$_s$**g$_s$a$_s$a$_s$g$_s$t$_s$g$_s$c$_s$a$_s$c$_s$**A$_s$^{m}C$_s$G**	x	x
26_1	GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$**A$_s$G$_s$G$_s$**t$_s$g$_s$a$_s$a$_s$g$_s$^{m}c$_s$g$_s$a$_s$a$_s$**G$_s$T$_s$G**	x	x
29_1	5'-Fig1J-$_o$G$_s$C$_s$A$_s$G$_s$A$_s$g$_s$g$_s$t$_s$g$_s$a$_s$a$_s$g$_s$c$_s$g$_s$a$_s$A$_s$G$_s$T$_s$G$_s$C-3'	x	x

[0720] 表9

[0721]

CMP ID NO	化合物	VIII	XIII
			
15_1	GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$**G$_s$^{m}C$_s$G$_s$**t$_s$a$_s$a$_s$a$_s$g$_s$a$_s$g$_s$a$_s$**G$_s$G'**	x	x
15_2	GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$**G$_s$^{m}C$_s$G$_s$**t$_s$a$_s$a$_s$a$_s$g$_s$a$_s$g$_s$**A$_s$G$_s$G**	x	x

[0722]

16_1	GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$**G$_s$** ^{m}**C$_s$G$_s$**t$_s$a$_s$a$_s$a$_s$g$_s$a$_s$g$_s$a$_s$ **G$_s$G$_s$T**	x	x
20_1	GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$**A$_s$G$_s$** ^{m}**C$_s$**g$_s$a$_s$a$_s$g$_s$t$_s$g$_s$c$_s$a$_s$ c$_s$a$_s$ ^{m}**C$_s$G$_s$G**	x	x
23_1	GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$**A$_s$G$_s$** ^{m}**C$_s$**g$_s$a$_s$a$_s$g$_s$t$_s$g$_s$c$_s$a$_s$ c$_s$**A$_s$** ^{m}**C$_s$G**	x	x
26_1	GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$**A$_s$G$_s$G$_s$**t$_s$g$_s$a$_s$a$_s$g$_s$ ^{m}c$_s$g$_s$a$_s$ a$_s$**G$_s$T$_s$G**	x	x
29_1	5'-Fig1J-$_o$G$_s$C$_s$A$_s$G$_s$A$_s$g$_s$g$_s$t$_s$g$_s$a$_s$a$_s$g$_s$c $_s$g$_s$a$_s$A$_s$G$_s$T$_s$G$_s$C-3'	x	x

[0723] 在本发明的一个实施方案中,药物组合选自由以下项组成的组:

[0724] CMP ID NO:15_1和VI,CMP ID NO:15_2和VI;CMP ID NO:16_1和VI;CMP ID NO:20_1和VI;CMP ID NO:23_1和VI;CMP ID NO:26_1和VI;CMP ID NO:29_1和VI;

[0725] CMP ID NO:15_1和VII,CMP ID NO:15_2和VII;CMP ID NO:16_1和VII;CMP ID NO:20_1和VII;CMP ID NO:23_1,VII;CMP ID NO:26_1和VII;CMP ID NO:29_1和VII;

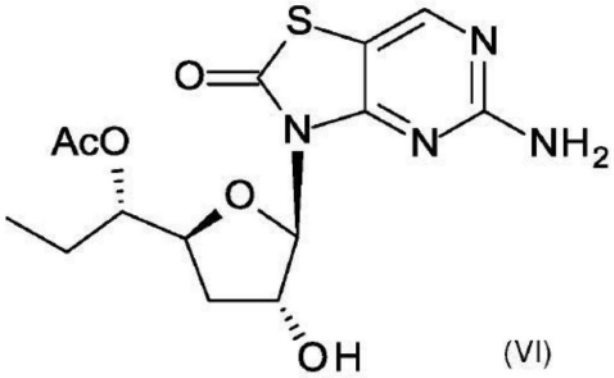
[0726] CMP ID NO:15_1和VIII,CMP ID NO:15_2和VIII;CMP ID NO:16_1和VIII;CMP ID NO:20_1和VIII;CMP ID NO:23_1和VII;CMP ID NO:26_1和VIII;CMP ID NO:29_1和VIII;以及

[0727] CMP ID NO:15_1和XIII,CMP ID NO:15_2和XIII;CMP ID NO:16_1和XIII;CMP ID NO:20_1和XIII;CMP ID NO:23_1和XIII;CMP ID NO:26_1和XIII以及CMP ID NO:29_1和XIII;

[0728] 或其药用盐、对映体或非对映体。

[0729] 在一个实施方案中,药物组合由以下组成:如图5所示的CMP ID NO:15_1的GalNAc缀合的反义寡核苷酸;以及为CMP ID NO:VI的TLR7激动剂:

[0730]



(VI)

[0731] 或其药用盐、对映体或非对映体。

[0732] 在包含反义寡核苷酸的药物组合的特别优选的实施方案中,TLR7激动剂为CMP ID NO:VI。

[0733] 术语"试剂盒"或"组分试剂盒"是指用于对HBV感染个体执行治疗的材料组装体,其包含对如何进行治疗的说明。

[0734] 本发明的一个方面是一种组分试剂盒，该组分试剂盒包含一种、两种或多种治疗有效成分(诸如医疗成分或药物)，其中它们中的两种选自如本文所述的治疗性寡核苷酸和如本文所述的TLR7激动剂。

[0735] 本发明的一个实施方案是一种组分试剂盒，该组分试剂盒包含如本文所述的治疗性寡核苷酸和如本文所述的TLR7激动剂作为医疗成分。

[0736] 在一个实施方案中，本发明的试剂盒包含：第一药物，该第一药物为如本文所述配制用于皮下注射的治疗性寡核苷酸；和第二药物，该第二药物为如本文所述配制用于口服施用的TLR7激动剂。治疗性寡核苷酸可被配制为在小瓶中具有一个或多个剂量或者在预装注射器中具有一个药学有效剂量的液体。另选地，治疗性寡核苷酸可呈冻干粉剂的形式，并且试剂盒包含用于制备用于注射的治疗性寡核苷酸的溶剂。应当理解，所有用于注射的药物都是无菌的。试剂盒中的TLR7激动剂可呈片剂形式(或另选的用于口服施用的单位剂量形式，诸如胶囊剂和凝胶剂)，其具有单一药学有效剂量pr.片剂，该试剂盒可包含多个片剂。

[0737] 在进一步的实施方案中，本发明的组分试剂盒进一步包含包装插页，该包装插页指导治疗性寡核苷酸与TLR7激动剂组合施用以治疗乙型肝炎病毒感染。特别地，包装插页描述了慢性乙型肝炎病毒感染的治疗。

[0738] 试剂盒可包含医疗成分和指导该医疗成分与其他医疗成分的组合使用的包装插页中的仅一者。在一个实施方案中，本发明的组分试剂盒包含或含有：第一药物，该第一药物为如本文所述的治疗性寡核苷酸；和包装插页，该包装插页指导第一药物与如本文所述的作为第二药物的TLR7激动剂的组合使用，但需单独购买该第二药物。在另一个实施方案中，本发明的组分试剂盒包含或含有：第一药物，该第一药物为如本文所述的TLR7激动剂；和包装插页，该包装插页指导第一药物与如本文所述的作为第二药物的治疗性寡核苷酸的组合使用，但需单独购买该第二药物。

[0739] 在一些实施方案中，本发明的药物组合可与第三或另外的治疗剂组合使用，该第三或另外的治疗剂可包含在组分试剂盒中或单独提供。该另外的治疗剂可以例如为用于治疗HBV感染，特别是慢性HBV感染的标准护理。

[0740] 12.应用

[0741] 本发明的药物组合用于治疗乙型肝炎病毒感染，特别是治疗慢性HBV患者。

[0742] 本发明的药物组合可用作治疗剂和用于预防。

[0743] 本发明的药物组合可用作组合的乙肝病毒靶向疗法和免疫治疗。特别地，当用于治疗感染细胞中的HBV时，本发明的药物组合能够影响以下HBV感染参数中的一个或多个HBV感染参数：i)减少细胞HBV mRNA，ii)减少血清中的HBV DNA，和/或iii)减少HBV病毒抗原，诸如HBsAg和HBeAg。在本发明的一个实施方案中，与当用药物组合的单个医疗成分执行治疗时所达到的效果相比，对这些参数中的一个或多个参数的效果得到改善。

[0744] 可使用HBV感染的原代人肝细胞或HBV感染的HepaRG细胞或ASGPR-HepaRG细胞在体外测量对HBV感染的作用(参见例如PCT/EP2018/078136)。也可使用以下项在体内测量对HBV感染的作用：感染了携带HBV基因组(AAV/HBV)的重组腺相关病毒(AAV)的小鼠的AAV/HBV小鼠模型(Dan Yang等人2014Cellular&Molecular Immunology 11,71-78)，或HBV微环小鼠(可获自Covance Shanghai，参见例如Guo等人2016Sci Rep 6:2552和Yan等人2017J

Hepatology 66(6):1149-1157),或人源化肝细胞PXB小鼠模型(可获自PhoenixBio,参见例如Kakuni等人2014Int.J.Mol.Sci.15:58-74)。对HBsAg和/或HBeAg分泌的抑制可以通过ELISA测定,例如使用CLIA ELISA试剂盒(Autobio Diagnostic)根据制造商的说明进行。HBV mRNA和pgRNA的减少可通过qPCR测量,例如,如"材料和方法"章节中所述。评估测试化合物是否抑制HBV感染的其他方法是通过例如WO 2015/173208中所述的qPCR测量HBV DNA的分泌,或使用Northern印迹杂交、原位杂交或免疫荧光测量。

[0745] 在本发明的一个实施方案中,如本文所述的靶向HBV mRNA的治疗性寡核苷酸和如本文所述的TLR7激动剂的药物组合提供了优于单一化合物治疗(单独的治疗性寡核苷酸或单独的TLR7激动剂)的优势。优势可以例如为i)与单一疗法相比时间延长的血清HBV-DNA减少;ii)与单一疗法相比延缓的HBsAg反弹;和/或iii)增加的治疗窗。与药品有关的术语"治疗窗"或"药物窗"是可有效治疗疾病而不会产生毒性作用的药品剂量范围。在本发明的一个实施方案中,与单一疗法相比,可通过组合治疗实现治疗窗的增加。

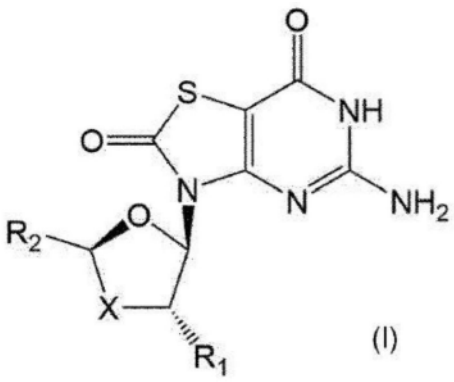
[0746] 在本申请的研究中已经观察到,与当使用单一疗法时所需的剂量相比,当使用组合治疗时可用3倍至5倍低的剂量实现显著改善的效果,并且当与较高剂量的相同组合相比时,可用3倍至5倍低的剂量的组合治疗实现基本相同的效果。例如,已经表明,对于单一疗法而言,需要高剂量(7.5mg/kg抗HBV反义寡核苷酸或每2天(QOD)100mg TLR7激动剂)来实现HBsAg的有效减少,与较高剂量的单一疗法相比,当使用较低剂量(1.5mg/kg和每周100mg(QW))的组合时,HBsAg降低至检测限以下并且反弹时间显著延长。此外,当使用每周一次而不是隔日一次施用的5倍低(对应于剂量减少4倍)剂量(1.5mg/kg相比7.5mg/kg)的抗HBV治疗性寡核苷酸结合TLR7激动剂的药物组合时,病毒参数HBsAg的反弹可延缓至相同程度。对于HBV-DNA减少也观察到类似的结果。

[0747] 本发明提供了用于治疗或预防HBV感染的方法,该方法包括向患有或易患HBV感染的受试者施用治疗或预防上有效量的本发明的药物组合。

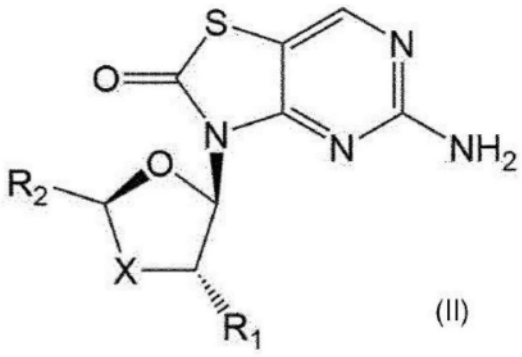
[0748] 本发明进一步的方面涉及本发明的药物组合抑制慢性HBV感染的发展或治疗慢性HBV感染的用途。

[0749] 本发明的一个方面是一种治疗感染HBV的个体,例如患有慢性HBV感染的个体的方法,该方法包括:向感染HBV的个体施用药学有效量的如本文所定义的治疗性寡核苷酸和药学有效量的式(I)或式(II)的TLR7激动剂:

[0750]



(I)



(II)

[0751] 其中X为CH_2或S;

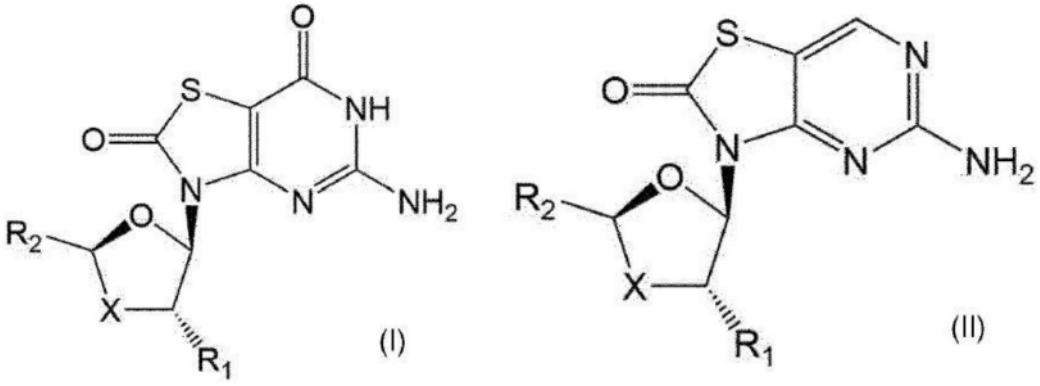
[0752] 对于式(I),R_1为-OH或-H,并且R_2为1-羟基丙基或羟基甲基,

[0753] 对于式(II),R_1为-OH或-H或乙酰氧基,并且R_2为1-乙酰氧基丙基或1-羟基丙基或

1-羟基甲基或乙酰氧基(环丙基)甲基或乙酰氧基(丙炔-1-基)甲基。

[0754] 本发明还涉及如申请中所述的用于用作组合治疗中的药物的治疗性寡核苷酸。本发明还涉及申请中所述的用于用作组合治疗中的药物的TLR7激动剂。

[0755] 特别地,如本文所定义的治疗性寡核苷酸和式(I)或式(II)的TLR7激动剂:

[0756] 

[0757] 其中X为CH_2或S;

[0758] 对于式(I),R_1为-OH或-H,并且R_2为1-羟基丙基或羟基甲基,

[0759] 对于式(II),R_1为-OH或-H或乙酰氧基,并且R_2为1-乙酰氧基丙基或1-羟基丙基或1-羟基甲基或乙酰氧基(环丙基)甲基或乙酰氧基(丙炔-1-基)甲基;

[0760] 用于治疗乙型肝炎病毒感染。

[0761] 本发明的一个实施方案是一种治疗性寡核苷酸在制备用于治疗乙型肝炎病毒感染(例如慢性HBV病毒感染)的第一药物中的用途,其中该第一药物为如本申请中所述的治疗性寡核苷酸,并且其中该第一药物有待与第二药物组合施用,其中该第二药物为如本申请中所述的TLR7激动剂。

[0762] 在本发明的一个实施方案中,含有治疗性寡核苷酸的药物组合物有待以皮下剂量施用。在本发明进一步的实施方案中,TLR7激动剂有待以口服剂量施用。因为药物组合物将通过两种不同的施用途径施用,所以它们可遵循不同的施用方案。

[0763] 根据本发明的药物组合通常以有效量施用。

[0764] 在一个实施方案中,如本申请中所述的治疗性寡核苷酸在24周至72周之间(诸如在36周至60周之间,例如48周)以每周一次或每月一次给药的方式以1mg/kg至4mg/kg的剂量范围皮下施用,并且如本申请中所述的TLR7激动剂历经8周至26周(诸如10周至24周,诸如12周或13周)隔日一次(QOD)随后历经24周至48周(诸如30周至40周,例如35周)每周一次施用(QW)以150mg至170mg之间范围的单位剂量口服施用。在隔日一次施用的时期中,可能有10周至14周(例如12周)的停止治疗期。TLR7激动剂的施用剂量在整个治疗期间为60个剂量至100个剂量之间,诸如75个剂量至90个剂量之间,诸如81个剂量、82个剂量、83个剂量或84个剂量。治疗性寡核苷酸的施用剂量为6个剂量至72个剂量之间,诸如9个剂量至15个剂量之间,诸如12个剂量或48个剂量。

[0765] 为了实现最佳组合效果,治疗性寡核苷酸和TLR7激动剂施用间隔少于一个月,例如少于一周,例如间隔两天,例如在同一天。

[0766] 13.使用方法

[0767] I.减少HBsAg表达

[0768] 在一些实施方案中,提供了用于将有效量的本发明的药物组合中的任一种药物组

合递送至细胞以用于减少HBsAg的表达的目的的方法，该药物组合包含本文公开的寡核苷酸，特别是本文公开的RNAi寡核苷酸。本文提供的方法可用于任何适当的细胞类型。在一些实施方案中，细胞为表达HBV抗原的任何细胞(例如，肝细胞、巨噬细胞、单核细胞衍生的细胞、前列腺癌细胞、脑细胞、内分泌组织、骨髓、淋巴结、肺、胆囊、肝脏、十二指肠、小肠、胰腺、肾脏、胃肠道、膀胱、脂肪和软组织以及皮肤)。在一些实施方案中，细胞为已经从受试者获得的原代细胞，并且可能已经经历了有限次数的传代，使得该细胞基本上保持其天然表型特性。在一些实施方案中，寡核苷酸被递送至的细胞为离体的或体外的(即，可被递送至培养中的细胞或递送至该细胞所驻留的生物体)。在特定的实施方案中，提供了用于将药物组合递送至细胞以用于仅减少HBsAg在肝细胞中的表达的目的的方法，该药物组合包含有效量的本文公开的寡核苷酸中的任一种寡核苷酸，特别是本文公开的RNAi寡核苷酸。

[0769] 在一些实施方案中，可使用适当的核酸递送方法引入本文公开的药物组合中的寡核苷酸，这些方法包括：注射包含寡核苷酸的溶液，通过被寡核苷酸覆盖的粒子进行轰击，将细胞或生物体暴露于含有寡核苷酸的溶液，或在寡核苷酸的存在下细胞膜的电穿孔。可使用用于将寡核苷酸递送至细胞的其他适当的方法，诸如脂质介导的载体运输、化学介导的运输和阳离子脂质体转染，例如磷酸钙等。

[0770] 抑制作用的结果可通过评估细胞或受试者的一种或多种特性的适当测定法或通过评估指示HBV抗原表达的分子(例如，RNA、蛋白质)的生化技术来确认。在一些实施方案中，通过将HBV抗原的表达水平(例如，mRNA或蛋白质水平)与适当的对照(例如，未向其递送药物组合或已向其递送阴性对照的细胞或细胞群中HBV抗原的表达水平)比较，来评估本文提供的药物组合的寡核苷酸降低HBV抗原的表达水平的程度。在一些实施方案中，HBV抗原表达的适当对照水平可以为预确定的水平或值，使得不需要每一次都测量对照水平。预确定的水平或值可采取各种形式。在一些实施方案中，预确定的水平或值可以为单个截断值，诸如中值或均值。

[0771] 在一些实施方案中，施用如本文所述的包含寡核苷酸(特别是本文所述的RNAi寡核苷酸)的药物组合导致细胞中HBV抗原(例如，HBsAg)表达的水平降低。在一些实施方案中，HBV抗原表达水平的降低可以为相比于HBV抗原的适当对照水平降低至1％或更低、5％或更低、10％或更低、15％或更低、20％或更低、25％或更低、30％或更低、35％或更低、40％或更低、45％或更低、50％或更低、55％或更低、60％或更低、70％或更低、80％或更低或者90％或更低。适当对照水平可以为未与如本文所述的包含寡核苷酸(特别是RNAi寡核苷酸)的药物组合接触的细胞或细胞群中HBV抗原表达的水平。在一些实施方案中，在有限的时间段之后评估根据本文所公开的方法将本发明的药物组合的寡核苷酸递送至细胞的作用。例如，可在将寡核苷酸引入细胞中之后至少8小时、12小时、18小时、24小时；或至少一天、两天、三天、四天、五天、六天、七天、十四天、二十一天、二十八天、三十五天、四十二天、四十九天、五十六天、六十三天、七十天、七十七天、八十四天、九十一天、九十八天、105天、112天、119天、126天、133天、140天或147天分析细胞中HBV抗原的水平。

[0772] 在一些实施方案中，在施用之后HBV抗原(例如，HBsAg)表达水平的降低持续延长的时间段。在一些实施方案中，在施用本发明的药物组合的寡核苷酸(特别地，其中寡核苷酸为反义寡核苷酸)之后，HBsAg表达的可检测的减少持续7天至70天的时间段范围。例如，在一些实施方案中，在施用寡核苷酸之后可检测的减少持续10天至70天、10天至60天、10天

至50天、10天至40天、10天至30天或10天至20天的时间段范围。在一些实施方案中，在施用本发明的药物组合的寡核苷酸(特别地，其中寡核苷酸为反义寡核苷酸)之后，可检测的减少持续20天至70天、20天至60天、20天至50天、20天至40天或20天至30天的时间段范围。在一些实施方案中，在施用本发明的药物组合的寡核苷酸(特别地，其中寡核苷酸为反义寡核苷酸)之后，可检测的减少持续30天至70天、30天至60天、30天至50天或30天至40天的时间段范围。在一些实施方案中，在施用本发明的药物组合的寡核苷酸(特别地，其中寡核苷酸为反义寡核苷酸)之后，可检测的减少持续40天至70天、40天至60天、40天至50天、50天至70天、50天至60天或60天至70天的时间段范围。

[0773] 在一些实施方案中，在施用本发明的药物组合的寡核苷酸(特别地，其中寡核苷酸为反义寡核苷酸)之后，HBsAg表达的可检测的减少持续2周至21周的时间段范围。例如，在一些实施方案中，在施用本发明的药物组合的寡核苷酸(特别地，其中寡核苷酸为反义寡核苷酸)之后，可检测的减少持续2周至20周、4周至20周、6周至20周、8周至20周、10周至20周、12周至20周、14周至20周、16周至20周或18周至20周的时间段范围。在一些实施方案中，在施用本发明的药物组合的寡核苷酸(特别地，其中寡核苷酸为反义寡核苷酸)之后，可检测的减少持续2周至16周、4周至16周、6周至16周、8周至16周、10周至16周、12周至16周或14周至16周的时间段范围。在一些实施方案中，在施用本发明的药物组合的寡核苷酸(特别地，其中寡核苷酸为反义寡核苷酸)之后，可检测的减少持续2周至12周、4周至12周、6周至12周、8周至12周或10周至12周的时间段范围。在一些实施方案中，在施用本发明的药物组合的寡核苷酸(特别地，其中寡核苷酸为反义寡核苷酸)之后，可检测的减少持续2周至10周、4周至10周、6周至10周或8周至10周的时间段范围。

[0774] 在一些实施方案中，本发明的药物组合的寡核苷酸(特别地，其中寡核苷酸为反义寡核苷酸)以被工程化为在细胞中表达寡核苷酸(例如，其正义链和反义链)的转基因的形式递送。在一些实施方案中，使用被工程化为表达本文所公开的任何寡核苷酸的转基因来递送本发明的药物组合的寡核苷酸(特别地，其中寡核苷酸为反义寡核苷酸)。可使用病毒介体(例如，腺病毒、逆转录病毒、牛痘病毒、痘病毒、腺相关病毒或单纯疱疹病毒)或非病毒介体(例如，质粒或合成mRNA)递送转基因。在一些实施方案中，本发明的药物组合的转基因可直接注射给受试者。

[0775] II.治疗方法

[0776] 本公开的各方面涉及用于减少HBsAg表达(例如，减少HBsAg表达)以治疗受试者的HBV感染的方法。在一些实施方案中，该方法可包括：向有需要的受试者施用包含有效量的本文所公开的寡核苷酸中的任一种寡核苷酸的药物组合。本公开提供了治疗处于HBV感染风险(或易感)和/或患有与HBV感染相关联的疾病或疾患的受试者的预防方法和治疗方法。

[0777] 在某些方面，本公开提供了一种用于通过向受试者施用治疗剂(例如，治疗性组合物、寡核苷酸或者编码该寡核苷酸的介体或转基因)而在受试者中预防如本文所述的疾病或疾患的方法。在一些实施方案中，特别地，其中治疗性组合物的寡核苷酸为RNAi寡核苷酸，待治疗的受试者为将从例如肝脏中HBsAg蛋白的量减少而在治疗上受益的受试者。可通过例如本领域已知的诊断或预后测定法中的一种或组合来鉴定具有疾病或疾患风险的受试者(例如，肝硬化和/或肝脏炎症的鉴定)。预防剂的施用可在疾病或疾患的特征性症状的检测或表现之前进行，使得疾病或疾患得以预防或另选地延缓其进展。

[0778] 本文所述的方法通常涉及向受试者施用有效量(即,能够产生期望的治疗结果的量)的治疗性组合。治疗上可接受的量可以为能够治疗疾病或疾患的量。对于任何一名受试者而言的适当剂量取决于某些因素,包括受试者的身材、体表面积、年龄、有待施用的特定组合物、组合物中的活性成分、施用的时间和途径、总体健康状况以及同时施用的其他药品。例如,剂量可在0.1mg/kg至12mg/kg的范围内。剂量也可在0.5mg/kg至10mg/kg的范围内。另选地,剂量可在1.0mg/kg至6.0mg/kg的范围内。剂量也可在3.0mg/kg至5.0mg/kg的范围内。

[0779] 在一些实施方案中,通过肠内(例如,口服、通过胃饲管、通过十二指肠饲管、经由胃造口术或通过直肠)、肠胃外(例如,皮下注射、静脉内注射或输注、动脉内注射或输注、骨内输注、肌内注射、脑内注射、脑室内注射、鞘内)、局部(例如,表皮、吸入、经由滴眼液或通过粘膜)或通过直接注射入靶器官(例如,受试者的肝脏)向受试者施用本文所公开的治疗性组合的组合物中的任一种组合物。通常,本文公开的治疗性组合的寡核苷酸通过静脉内或皮下施用。

[0780] 作为一组非限制性实例,本公开的治疗性组合的寡核苷酸通常会每季度一次(每三个月一次)、每两月一次(每两个月一次)每月一次或每周一次施用。例如,寡核苷酸可每一周一次、每两周一次或每三周一次施用。寡核苷酸可每天施用。

[0781] 在一个优选的实施方案中,本发明的RNAi化合物为靶向HBV的siRNA,其以0.1mg/kg至7mg/kg之间、优选地0.5mg/kg至6.5mg/kg之间、最优选地1mg/kg至6mg/kg之间的剂量皮下施用。在一个实施方案中,该剂量每两周一次、每四周一次或每六周一次施用。在一个优选的实施方案中,该剂量每月一次施用。在一个特别优选的实施方案中,每月一次施用1mg/kg至6mg/kg之间的剂量。“一个月一次”应理解为意味着以大约一个日历月长度的时间间隔施用连续剂量。

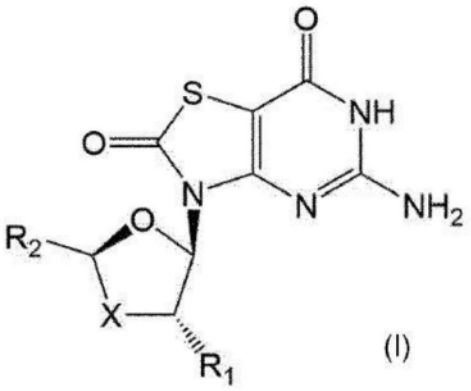
[0782] 在一些实施方案中,有待治疗的受试者是人类或非人灵长类动物或其他哺乳动物受试者。其他示例性受试者包括家养动物,诸如狗和猫;家畜,诸如马、牛、猪、绵羊、山羊和鸡;以及动物,诸如小鼠、大鼠、豚鼠和仓鼠等。

[0783] 实施方案

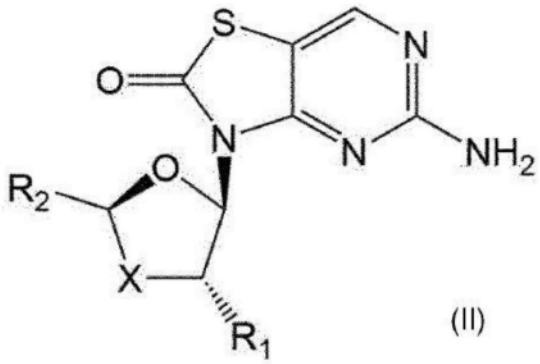
[0784] 本发明的以下实施方案可以与本文描述的任何其他实施方案联合使用。

[0785] 1.一种药物组合,其包含以下项或由以下项组成:治疗性寡核苷酸和式(I)或式(II)的TLR7激动剂:

[0786]



(I)



(II)

[0787] 其中X为CH_2或S;

[0788] 对于式(I),R_1为-OH或-H,并且R_2为1-羟基丙基或羟基甲基,

[0789] 对于式(II),R_1为-OH或-H或乙酰氧基,并且R_2为1-乙酰氧基丙基或1-羟基丙基或1-羟基甲基或乙酰氧基(环丙基)甲基或乙酰氧基(丙炔-1-基)甲基,

[0790] 或其药用盐、对映体或非对映体。

[0791] 2.根据实施方案1所述的药物组合,其中该治疗性寡核苷酸为RNAi寡核苷酸。

[0792] 3.根据实施方案2所述的药物组合,其中该RNAi寡核苷酸为靶向HBV的寡核苷酸(RNAi ID NO:1)。

[0793] 4.根据实施方案2或3所述的药物组合,其中该RNAi寡核苷酸为靶向HBsAg mRNA的寡核苷酸(RNAi ID NO:2)。

[0794] 5.根据实施方案2至4中任一项所述的药物组合,其中该RNAi寡核苷酸为减少HBsAg mRNA的表达的寡核苷酸(RNAi ID NO:3)。

[0795] 6.根据实施方案2至5中任一项所述的药物组合,其中该RNAi寡核苷酸为包含长度为19个至30个核苷酸的反义链的寡核苷酸,其中该反义链包含与HBsAg mRNA的如ACAANAAUCCUCACAAUA(SEQ ID NO:33)所示的序列互补的区(RNAi ID NO:4)。

[0796] 7.根据实施方案2至5中任一项所述的药物组合,其中该RNAi寡核苷酸为用于减少乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)mRNA的表达的寡核苷酸,该寡核苷酸包含长度为19个至30个核苷酸的反义链,其中该反义链包含与HBsAg mRNA的如ACAANAAUCCUCACAAUA(SEQ ID NO:33)所示的序列互补的区(RNAi ID NO:5)。

[0797] 8.根据实施方案6或7所述的药物组合,其中该RNAi寡核苷酸进一步包含长度为19个至50个核苷酸的正义链,其中该正义链与该反义链形成双链体区。

[0798] 9.根据实施方案8所述的药物组合,其中该正义链包含与如UUNUUGUGAGGAUUN(SEQ ID NO:34)所示的序列互补的区。

[0799] 10.根据实施方案8或9所述的药物组合,其中该正义链包含与如5’-UUAUUGUGAGGAUUNUUGUC(SEQ ID NO:35)所示的序列互补的区。

[0800] 11.根据实施方案9所述的药物组合,其中该反义链包含如UUAUUGUGAGGAUUNUUGUCGG(SEQ ID NO:36)所示的序列。

[0801] 12.根据实施方案9所述的药物组合,其中该反义链由如UUAUUGUGAGGAUUCUUGUCGG(SEQ ID NO:37)所示的序列组成。

[0802] 13.根据实施方案9所述的药物组合,其中该反义链由如UUAUUGUGAGGAUUUUUGUCGG(SEQ ID NO:38)所示的序列组成。

[0803] 14.根据实施方案8至12中任一项所述的药物组合,其中该正义链包含如ACAANAAUCCUCACAAUAA(SEQ ID NO:39)所示的序列。

[0804] 15.根据实施方案8至14中任一项所述的药物组合,其中该正义链包含如GACAANAAUCCUCACAAUAAGCAGCCGAAAGGCUGC(SEQ ID NO:40)所示的序列。

[0805] 16.根据实施方案8至14中任一项所述的药物组合,其中该正义链由如GACAAAAAUCCUCACAAUAAGCAGCCGAAAGGCUGC(SEQ ID NO:41)所示的序列组成。

[0806] 17.根据实施方案8至14中任一项所述的药物组合,其中该正义链由如GACAAGAAUCCUCACAAUAAGCAGCCGAAAGGCUGC(SEQ ID NO:42)所示的序列组成。

[0807] 18.根据实施方案2至5中任一项所述的药物组合,其中该RNAi寡核苷酸为用于减

少乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)mRNA的表达的寡核苷酸,该寡核苷酸包含与反义链形成双链体区的正义链,其中该正义链包含如GACAAAAAUCCUCACAAUAAGCAGCCGAAAGGCUGC(SEQ ID NO:41)所示的序列,其中该反义链包含如UUAUUGUGAGGAUUUUUGUCGG(SEQ ID NO:38)所示的序列,

[0808] 其中该反义链和该正义链中的每一者包含一个或多个2'-氟和2'-O-甲基修饰的核苷酸以及至少一个硫代磷酸酯键,其中该反义链的5'-核苷酸的糖的4'-碳包含磷酸类似物,并且其中该正义链缀合至一个或多个N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)部分。

[0809] 19.根据实施方案2至5中任一项所述的药物组合,其中该RNAi寡核苷酸为用于减少乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)mRNA的表达的寡核苷酸,该寡核苷酸包含与反义链形成双链体区的正义链,其中:

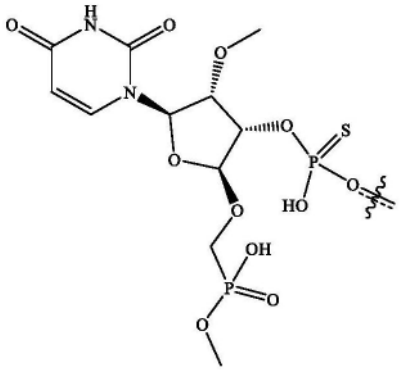
[0810] 该正义链包含如GACAAAAAUCCUCACAAUAAGCAGCCGAAAGGCUGC(SEQ ID NO:41)所示的序列,并且包含:在第3位、第8位至第10位、第12位、第13位和第17位处的2'-氟修饰的核苷酸;在第1位、第2位、第4位至第7位、第11位、第14位至第16位、第18位至第26位和第31位至第36位处的2'-O-甲基修饰的核苷酸;以及至少一个硫代磷酸酯核苷酸间键,其中该正义链缀合至一个或多个N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)部分;并且

[0811] 该反义链包含如UUAUUGUGAGGAUUUUUGUCGG(SEQ ID NO:38)所示的序列,并且包含:在第2位、第3位、第5位、第7位、第8位、第10位、第12位、第14位、第16位和第19位处的2'-氟修饰的核苷酸;在第1位、第4位、第6位、第9位、第11位、第13位、第15位、第17位、第18位和第20位至第22位处的2'-O-甲基修饰的核苷酸;以及至少三个硫代磷酸酯核苷酸间键,其中该反义链的5'-核苷酸的糖的4'-碳包含磷酸类似物。

[0812] 20.根据实施方案19所述的药物组合,其中该正义链包含在第1位和第2位处的核苷酸之间的硫代磷酸酯键。

[0813] 21.根据实施方案19或20所述的药物组合,其中该反义链包含核苷酸1与核苷酸2之间、核苷酸2与核苷酸3之间、核苷酸3与核苷酸4之间、核苷酸20与核苷酸21之间以及核苷酸21与核苷酸22之间的五个硫代磷酸酯键。

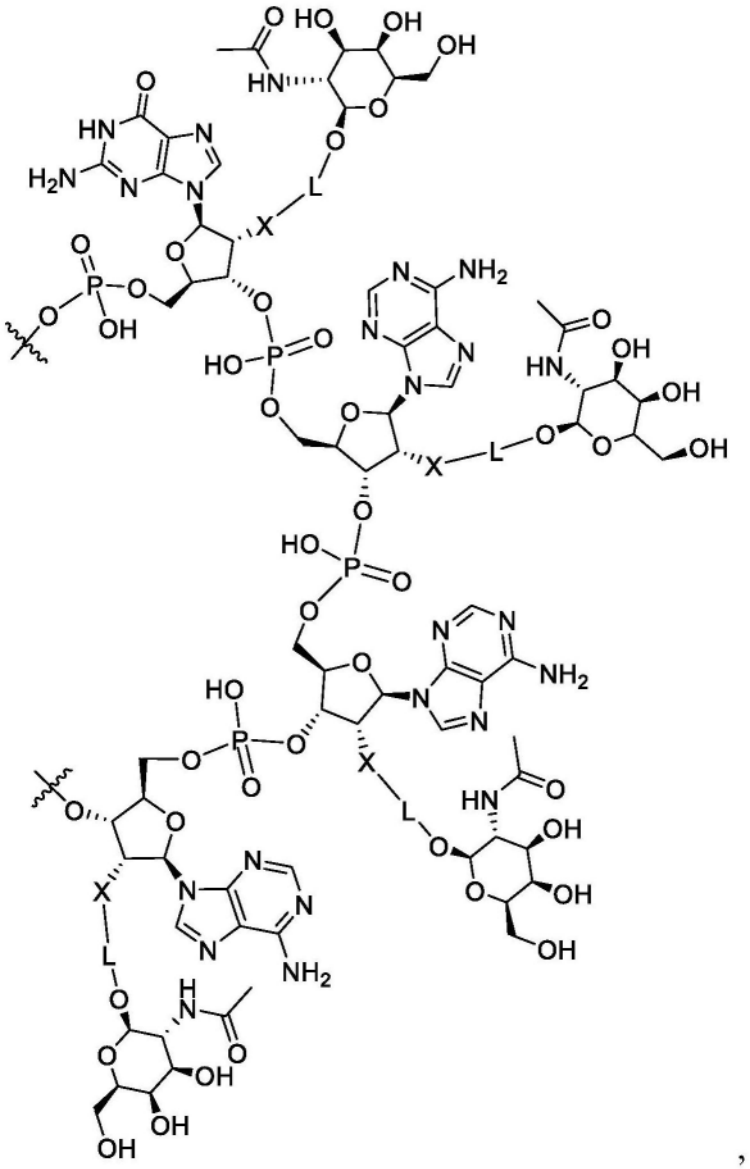
[0814] 22.根据实施方案19至21中任一项所述的药物组合,其中该反义链的该5'-核苷酸具有以下结构:

[0815] 

[0816] 23.根据实施方案19至22中任一项所述的药物组合,其中该正义链上的-GAAA-序列的核苷酸中的一个或多个核苷酸缀合至单价GalNAc部分。

[0817] 24.根据实施方案23所述的药物组合,其中该正义链上的该-GAAA-序列的核苷酸中的每个核苷酸缀合至单价GalNAc部分。

[0818] 25.根据实施方案24所述的药物组合,其中-GAAA-基序包含以下结构:

[0819] 

[0820] 其中:

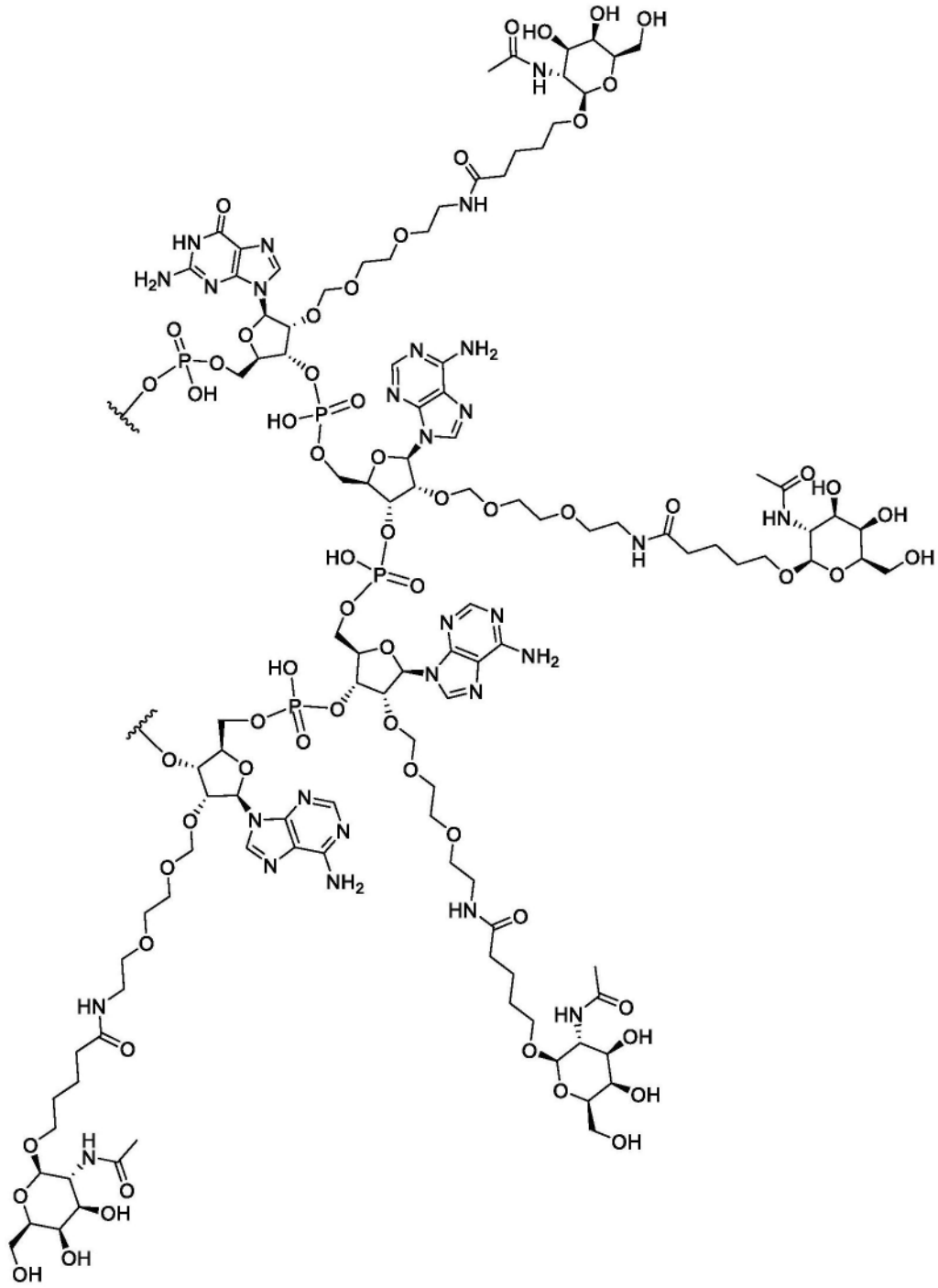
[0821] L代表键、点击化学柄、或长度为包含端值在内的1个至20个连续的、共价键合的原子的接头,所述接头选自由以下项组成的组:取代的和未取代的亚烷基、取代的和未取代的亚烯基、取代的和未取代的亚炔基、取代的和未取代的亚杂烷基、取代的和未取代的亚杂烯基、取代的和未取代的亚杂炔基以及它们的组合;并且

[0822] X为O、S或N。

[0823] 26.根据实施方案25所述的药物组合,其中L为乙缩醛接头。

[0824] 27.根据实施方案25或26所述的药物组合,其中X为O。

[0825] 28.根据实施方案20所述的药物组合,其中-GAAA-序列包含以下结构:

[0826] 

[0827] 29.根据实施方案8所述的药物组合,其中该正义链在其3'-端包含如下所示的茎环:S_1-L-S_2,其中S_1与S_2互补,并且其中L在S_1与S_2之间形成长度为至多6个核苷酸的环。

[0828] 30.根据实施方案29所述的药物组合,其中L为四环。

[0829] 31.根据实施方案29或30所述的药物组合,其中L在S_1与S_2之间形成长度为4个核苷酸的环。

[0830] 32.根据实施方案29至31中任一项所述的药物组合,其中L包含如GAAA所示的序列。

[0831] 33.根据实施方案29至32中任一项所述的药物组合,其中该茎环的L的至多4个核苷酸各自缀合至单独的GalNAc。

[0832] 34.根据实施方案6至16中任一项所述的药物组合,其中该RNAi寡核苷酸包含至少一个经修饰的核苷酸。

[0833] 35.根据实施方案34所述的药物组合,其中该经修饰的核苷酸包含2'-修饰。

[0834] 36.根据实施方案35所述的药物组合,其中该2'-修饰是选自以下项的修饰:2'-氨基乙基、2'-氟、2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基和2'-脱氧-2'-氟-β-d-阿糖核酸。

[0835] 37.根据实施方案6至16中任一项所述的药物组合,其中该RNAi寡核苷酸的所有核苷酸都是经修饰的核苷酸。

[0836] 38.根据实施方案6至16中任一项所述的药物组合,其中该RNAi寡核苷酸包含至少一个经修饰的核苷酸间键。

[0837] 39.根据实施方案38所述的药物组合,其中该至少一个经修饰的核苷酸间键为硫代磷酸酯键。

[0838] 40.根据实施方案6至16中任一项所述的药物组合,其中该反义链的5'-核苷酸的糖的4'-碳包含磷酸类似物。

[0839] 41.根据实施方案6至16中任一项所述的药物组合,其中该寡核苷酸的至少一个核苷酸缀合至靶向配体。

[0840] 42.根据实施方案41所述的药物组合,其中该靶向配体为N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)部分。

[0841] 43.根据实施方案2至5中任一项所述的药物组合,其中该RNAi寡核苷酸为用于减少乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)mRNA的表达的寡核苷酸,该寡核苷酸包含与反义链形成双链体区的正义链,其中:

[0842] 该正义链由如GACAAAAAUCCUCACAAUAAGCAGCCGAAAGGCUGC(SEQ ID NO:41)所示的序列组成,并且包含:在第3位、第8位至第10位、第12位、第13位和第17位处的2'-氟修饰的核苷酸;在第1位、第2位、第4位至第7位、第11位、第14位至第16位、第18位至第26位和第31位至第36位处的2'-O-甲基修饰的核苷酸;以及在第1位和第2位处的核苷酸之间的硫代磷酸酯键,其中该正义链上的-GAAA-序列的核苷酸中的每个核苷酸缀合至单价GalNAc部分;并且

[0843] 该反义链由如UUAUUGUGAGGAUUUUUGUCGG(SEQ ID NO:38)所示的序列组成,并且包含在第2位、第3位、第5位、第7位、第8位、第10位、第12位、第14位、第16位和第19位处的2'-氟修饰的核苷酸;在第1位、第4位、第6位、第9位、第11位、第13位、第15位、第17位、第18位和第20位至第22位处的2'-O-甲基修饰的核苷酸;以及在第1位和第2位处的核苷酸之间、在第2位和第3位处的核苷酸之间、在第3位和第4位处的核苷酸之间、在第20位和第21位处的核苷酸之间以及在第21位和第22位处的核苷酸之间的硫代磷酸酯键,

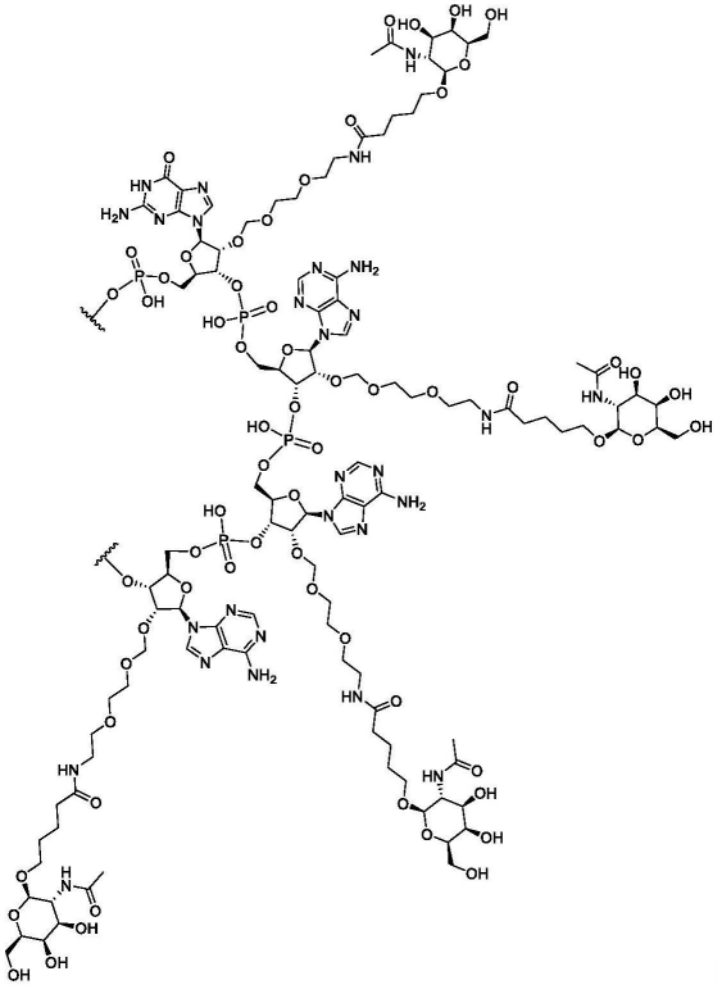
[0844] 其中所述反义链的5'-核苷酸的糖的4'-碳包含甲氧基膦酸酯(MOP)(RNAi ID NO:6)。

[0845] 44.根据实施方案2至5中任一项所述的药物组合,其中该RNAi寡核苷酸为用于减少乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)mRNA的表达的寡核苷酸,该寡核苷酸包含与反义链形成双链体区的正义链,其中:

[0846] 该正义链包含如GACAAAAAUCCUCACAAUAAGCAGCCGAAAGGCUGC(SEQ ID NO:41)所示的序列,并且包含:在第3位、第8位至第10位、第12位、第13位和第17位处的2'-氟修饰的核

苷酸;在第1位、第2位、第4位至第7位、第11位、第14位至第16位、第18位至第26位和第31位至第36位处的2'-O-甲基修饰的核苷酸;以及在第1位和第2位处的核苷酸之间的一个硫代磷酸酯核苷酸间键,其中该正义链上的-GAAA-序列的核苷酸中的每个核苷酸缀合至单价GalNAc部分;其中该-GAAA-序列包含以下结构:

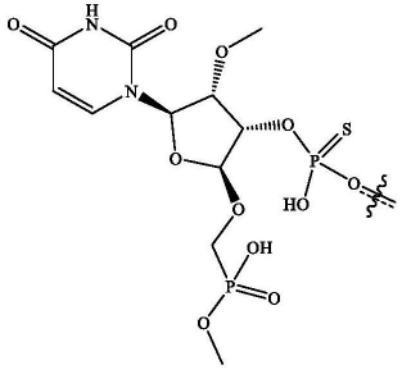
[0847]



;

并且

[0848] 该反义链包含如UUAUUGUGAGGAUUUUUGUCGG(SEQ ID NO:38)所示的序列,并且包含:在第2位、第3位、第5位、第7位、第8位、第10位、第12位、第14位、第16位和第19位处的2'-氟修饰的核苷酸;在第1位、第4位、第6位、第9位、第11位、第13位、第15位、第17位、第18位和第20位至第22位处的2'-O-甲基修饰的核苷酸;以及核苷酸1与核苷酸2之间、核苷酸2与核苷酸3之间、核苷酸3与核苷酸4之间、核苷酸20与核苷酸21之间以及核苷酸21与核苷酸22之间的五个硫代磷酸酯核苷酸间键,其中该反义链的5'-核苷酸的糖的4'-碳具有以下结构:

[0849] 

(RNAi ID NO: 7)。

[0850] 45.根据实施方案2至5中任一项所述的药物组合,其中该RNAi寡核苷酸具有图29A所示的结构(RNAi ID NO:8)。

[0851] 46.根据实施方案2至5中任一项所述的药物组合,其中该RNAi寡核苷酸为寡核苷酸HBV(s)-219(RNAi ID NO:9)。

[0852] 47.根据实施方案1所述的药物组合,其中该治疗性寡核苷酸为长度为13个至22个核苷酸的GalNAc缀合的反义寡核苷酸,其具有与SEQ ID NO:1的从第1530位至第1602位的连续序列100%互补的至少12个核苷酸的连续核苷酸序列。

[0853] 48.根据实施方案47所述的药物组合,其中该连续核苷酸序列与选自由以下项组成的组的靶序列100%互补:SEQ ID NO:1的第1530位至第1598位、第1530位至第1543位、第1530位至第1544位、第1531位至第1543位、第1551位至第1565位、第1551位至第1566位、第1577位至第1589位、第1577位至第1591位、第1577位至第1592位、第1578位至第1590位、第1578位至第1592位、第1583位至第1598位、第1584位至第1598位、第1585位至第1598位以及第1583位至第1602位。

[0854] 49.根据实施方案47或48所述的药物组合,其中该连续核苷酸序列的长度在12个至16个核苷酸之间。

[0855] 50.根据实施方案47至49中任一项所述的药物组合,其中该GalNAc缀合的反义寡核苷酸的该连续核苷酸序列选自由以下项组成的组:

[0856] gcgtaaagagagg(SEQ ID NO:2);

[0857] gcgtaaagagaggt(SEQ ID NO:3);

[0858] cgcgtaaagagaggt(SEQ ID NO 4);

[0859] agaaggcacagacgg(SEQ ID NO 5);

[0860] gagaaggcacagacgg(SEQ ID NO 6);

[0861] agcgaagtgcacacgg(SEQ ID NO 7);

[0862] gaagtgcacacgg(SEQ ID NO 8);

[0863] gcgaagtgcacacgg(SEQ ID NO 9);

[0864] agcgaagtgcacacg(SEQ ID NO:10);

[0865] cgaagtgcacacg(SEQ ID NO 11);

[0866] aggtgaagcgaagtgc(SEQ ID NO:12);

[0867] aggtgaagcgaagtg(SEQ ID NO:13);

[0868] aggtgaagcgaagt(SEQ ID NO 14);和

[0869] gcagaggtgaagcgaagtgc(SEQ ID NO:29),或其药用盐。

[0870] 51.根据实施方案47至50中任一项所述的药物组合,其中该GalNAc缀合的反义寡核苷酸的该连续核苷酸序列为式5'-F-G-F'-3'的缺口聚体,其中区F和F'独立地由2个至5个2'糖修饰的核苷酸组成并定义F和F'区的5'和3'端,并且G是能够募集RNase H的6个至10个DNA核苷之间的区。

[0871] 52.根据实施方案51所述的药物组合,其中2'糖修饰的核苷独立地选自由以下项组成的组:2'-O-烷基-RNA、2'-O-甲基-RNA、2'-烷氧基-RNA、2'-O-甲氧基乙基-RNA、2'-氨基-DNA、2'-氟-DNA、2'-氟-ANA和LNA核苷。

[0872] 53.根据实施方案51或52所述的药物组合,其中一个或多个2'糖修饰的核苷为MOE核苷。

[0873] 54.根据实施方案51或52所述的药物组合,其中一个或多个2'糖修饰的核苷为LNA核苷。

[0874] 55.根据实施方案54所述的药物组合,其中修饰的LNA核苷选自氧基-LNA、氨基-LNA、硫代-LNA、cET和ENA。

[0875] 56.根据实施方案54或55所述的药物组合,其中修饰的LNA核苷为具有以下2'-4'桥-O-CH_2-的氧基-LNA。

[0876] 57.根据实施方案56所述的药物组合,其中该氧基-LNA为β-D-氧基-LNA。

[0877] 58.根据实施方案54或55所述的药物组合,其中修饰的LNA核苷为具有以下2'-4'桥-O-CH(CH_3)-的cET。

[0878] 59.根据实施方案58所述的药物组合,其中该cET为(S)cET,即6'(S)甲基-β-D-氧基-LNA。

[0879] 60.根据实施方案54或55所述的药物组合,其中LNA为具有以下2'-4'桥-O-CH_2-CH_2-的ENA。

[0880] 61.根据实施方案47至60中任一项所述的药物组合,其中该GalNAc缀合的反义寡核苷酸的该连续核苷酸序列选自由以下项组成的组:

[0881] GCGtaaagagaGG(SEQ ID NO:2);

[0882] GCGtaaagagAGG(SEQ ID NO:2);

[0883] GCGtaaagagaGGT(SEQ ID NO:3);

[0884] CGCgtaaagagaGGT(SEQ ID NO:4);

[0885] AGAaggcacagaCGG(SEQ ID NO:5);

[0886] GAGaaggcacagaCGG(SEQ ID NO:6);

[0887] AGCgaagtgcacaCGG(SEQ ID NO:7);

[0888] GAAgtgcacacGG(SEQ ID NO:8);

[0889] GAAgtgcacaCGG(SEQ ID NO:8);

[0890] GCGaagtgcacaCGG(SEQ ID NO:9);

[0891] AGCgaagtgcacACG(SEQ ID NO:10);

[0892] CGAagtgcacaCG(SEQ ID NO:11);

[0893] AGGtgaagcgaagTGC(SEQ ID NO:12);

[0894] AGGtgaagcgaaGTG(SEQ ID NO:13);

[0895] AGgtgaagcgaAGTG(SEQ ID NO:13)；

[0896] AGGtgaagcgaAGT(SEQ ID NO:14)；和

[0897] GCAGAGgtgaagcgaAGTGC(SEQ ID NO:29)；

[0898] 其中大写字母表示LNA核苷或MOE核苷，并且小写字母表示DNA核苷。

[0899] 62.根据实施方案47至61中任一项所述的药物组合，其中该连续核苷酸序列内的核苷间键的至少50％为硫代磷酸酯核苷间键。

[0900] 63.根据实施方案47至62中任一项所述的药物组合，其中该GalNAc缀合的反义寡核苷酸的该连续核苷酸序列内的所有核苷间键都为硫代磷酸酯核苷间键。

[0901] 64.根据实施方案47至63中任一项所述的药物组合，其中该GalNAc缀合的反义寡核苷酸的GalNAc缀合物为二价、三价或四价GalNAc簇。

[0902] 65.根据实施方案64所述的药物组合，其中该GalNAc缀合物选自图1B、图1D或图1J。

[0903] 66.根据实施方案47至65中任一项所述的药物组合，其中GalNAc缀合物和该GalNAc缀合的反义寡核苷酸的该连续核苷酸序列通过包含两个、三个、四个或五个磷酸二酯联接的DNA核苷的PO接头共价联接。

[0904] 67.根据实施方案66所述的药物组合，其中该PO接头为该反义寡核苷酸的一部分并由胞嘧啶和腺嘌呤(CA)的二核苷酸序列组成，该CA的该二核苷酸序列具有至少两个磷酸二酯键，一个磷酸二酯键在该C与该A之间，并且一个磷酸二酯键联接至GalNAc簇。

[0905] 68.根据实施方案47至67中任一项所述的药物组合，其中该GalNAc缀合的反义寡核苷酸的长度为12个至18个核苷酸。

[0906] 69.根据实施方案47至68中任一项所述的药物组合，其中该GalNAc缀合的反义寡核苷酸选自由以下项组成的组：

[0907] 5’-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$G$_s$^{m}C$_s$G$_s$t$_s$a$_s$a$_s$a$_s$g$_s$a$_s$g$_s$a$_s$G$_s$G-3’ SEQ ID NO:15

[0908] 5’-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$G$_s$^{m}C$_s$G$_s$t$_s$a$_s$a$_s$a$_s$g$_s$a$_s$g$_s$A$_s$G$_s$G-3’ SEQ ID NO:15

[0909] 5’-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$G$_s$^{m}C$_s$G$_s$t$_s$a$_s$a$_s$a$_s$g$_s$a$_s$g$_s$a$_s$G$_s$G$_s$T-3’ SEQ ID NO:16

[0910] 5’-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$^{m}C$_s$G$_s$^{m}C$_s$g$_s$t$_s$a$_s$a$_s$a$_s$g$_s$a$_s$g$_s$a$_s$G$_s$G$_s$T-3’ SEQ ID NO:17

[0911] 5’-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$A$_s$G$_s$A$_s$a$_s$g$_s$g$_s$c$_s$a$_s$c$_s$a$_s$g$_s$a$_s$^{m}C$_s$G$_s$G-3’ SEQ ID NO:18

[0912] 5’-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$G$_s$A$_s$G$_s$a$_s$a$_s$g$_s$g$_s$c$_s$a$_s$c$_s$a$_s$g$_s$a$_s$^{m}C$_s$G$_s$G-3’ SEQ ID NO:19

[0913] 5’-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$A$_s$G$_s$^{m}C$_s$g$_s$a$_s$a$_s$g$_s$t$_s$g$_s$c$_s$a$_s$c$_s$a$_s$^{m}C$_s$G$_s$G-3’ SEQ ID NO:20

[0914] 5’-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$G$_s$A$_s$A$_s$g$_s$t$_s$g$_s$c$_s$a$_s$c$_s$a$_s$^{m}c$_s$G$_s$G-3’ SEQ ID NO:21

[0915] 5’-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$G$_s$A$_s$A$_s$g$_s$t$_s$g$_s$c$_s$a$_s$c$_s$a$_s$^{m}C$_s$G$_s$G-3’ SEQ ID NO:21

[0916] 5’-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$G$_s$^{m}C$_s$G$_s$a$_s$a$_s$g$_s$t$_s$g$_s$c$_s$a$_s$c$_s$a$_s$^{m}C$_s$G$_s$G-3’ SEQ ID NO:22

[0917] 5’-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$A$_s$G$_s$^{m}C$_s$g$_s$a$_s$a$_s$g$_s$t$_s$g$_s$c$_s$a$_s$c$_s$A$_s$^{m}C$_s$G-3’ SEQ ID NO:23

[0918] 5’-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$^{m}C$_s$G$_s$A$_s$a$_s$g$_s$t$_s$g$_s$c$_s$a$_s$c$_s$a$_s$^{m}C$_s$G-3’ SEQ ID NO:24

[0919] 5’-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$A$_s$G$_s$G$_s$t$_s$g$_s$a$_s$a$_s$g$_s$^{m}c$_s$g$_s$a$_s$a$_s$g$_s$T$_s$G$_s$^{m}C-3’ SEQ ID NO:25

[0920] 5’-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$A$_s$G$_s$g$_s$t$_s$g$_s$a$_s$a$_s$g$_s$^{m}c$_s$g$_s$a$_s$A$_s$G$_s$T$_s$G-3’ SEQ ID NO:26

[0921] 5’-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$A$_s$G$_s$G$_s$t$_s$g$_s$a$_s$a$_s$g$_s$^{m}c$_s$g$_s$a$_s$a$_s$G$_s$T$_s$G-3’ SEQ ID NO:26；和

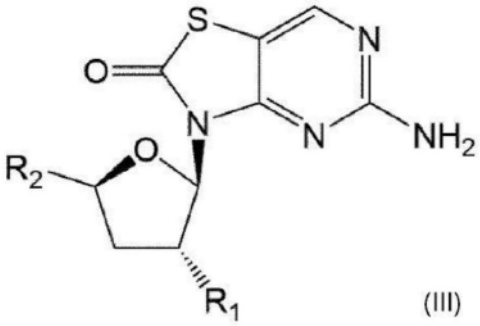
[0922] 5’-GN2-C6$_o$c$_o$a$_o$A$_s$G$_s$G$_s$t$_s$g$_s$a$_s$a$_s$g$_s$^{m}c$_s$g$_s$a$_s$A$_s$G$_s$T-3’ SEQ ID NO:27

[0923] 其中大写粗体字母表示β-D-氧基-LNA单元；小写字母表示DNA单元；下标“o”表示

磷酸二酯键;下标“s”表示硫代磷酸酯键;上标m表示含有5-甲基胞嘧啶碱基的DNA或β-D-氧基-LNA单元;GN2-C6表示具有C6接头的GalNAc2缀合物,或其药用盐。

[0924] 70.根据实施方案47至69中任一项所述的药物组合,其中该GalNAc缀合的反义寡核苷酸为5’-Fig1J-$_{o}\underline{G_sC_sA_sG_sA_s}g_sg_st_sg_sa_sa_sg_sc_sg_sa_s\underline{A_sG_sT_sG_sC}$-3’(图2),其中带下划线的大写的带下划线的字母表示MOE单元;小写字母表示DNA单元;下标“o”表示磷酸二酯键;下标“s”表示硫代磷酸酯键。

[0925] 71.根据实施方案1至70中任一项所述的药物组合,其中该TLR7激动剂具有式(III):

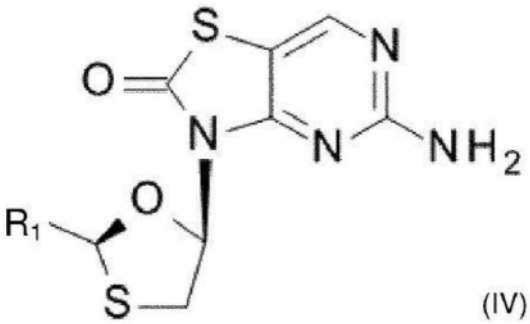
[0926] 

(III)

[0927] 其中R_1为-OH或乙酰氧基,并且R_2为1-乙酰氧基丙基或1-羟基丙基或1-羟基甲基

[0928] 或其药用盐、对映体或非对映体。

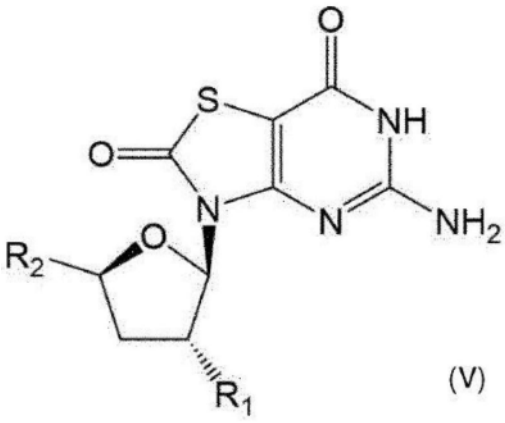
[0929] 72.根据实施方案1至70中任一项所述的药物组合,其中该TLR7激动剂具有式(IV):

[0930] 

(IV)

[0931] 其中R_1为乙酰氧基(环丙基)甲基或乙酰氧基(丙炔-1-基)甲基。

[0932] 73.根据实施方案1至70中任一项所述的药物组合,其中该TLR7激动剂具有式(V):

[0933] 

(V)

[0934] 其中R_1为-OH,并且R_2为1-羟基丙基或羟基甲基

[0935] 或其药用盐、对映体或非对映体。

[0936] 74.根据实施方案1至73中任一项所述的药物组合，其中该TLR7激动剂选自由以下项组成的组：

[0937] [(1S)-1-[(2S,4R,5R)-5-(5-氨基-2-氧代-噻唑并[4,5-d]嘧啶-3-基)-4-羟基-四氢呋喃-2-基]丙基]乙酸酯(CMP ID NO:VI)；

[0938] 5-氨基-3-[(2R,3R,5S)-3-羟基-5-[(1S)-1-羟基丙基]四氢呋喃-2-基]-6H-噻唑并[4,5-d]嘧啶-2,7-二酮(CMP ID NO:VII)；

[0939] 5-氨基-3-[(2R,3R,5S)-3-羟基-5-[(1S)-1-羟基丙基]四氢呋喃-2-基]噻唑并[4,5-d]嘧啶-2-酮(CMP ID NO:VIII)；

[0940] 5-氨基-3-(3'-脱氧-β-D-呋喃核糖基)-3H-噻唑并[4,5-d]嘧啶-2-酮(CMP ID NO:IX)；

[0941] 5-氨基-3-(2'-O-乙酰基-3'-脱氧-β-D-呋喃核糖基)-3H-噻唑并[4,5-d]嘧啶-2-酮(CMP ID NO:X)；

[0942] 5-氨基-3-(3'-脱氧-β-D-呋喃核糖基)-3H,6H-噻唑并[4,5-d]嘧啶-2,7-二酮(CMP ID NO:XI)；

[0943] [(S)-[(2S,5R)-5-(5-氨基-2-氧代-噻唑并[4,5-d]嘧啶-3-基)-1,3-氧杂硫杂环戊烷-2-基]-环丙基-甲基]乙酸酯(CMP ID NO:XII)；和

[0944] (1S)-1-[(2S,5R)-5-(5-氨基-2-氧代-噻唑并[4,5-d]嘧啶-3-基)-1,3-氧杂硫杂环戊烷-2-基]丁-2-炔基]乙酸酯(CMP ID NO:XIII)；

[0945] 或其药用盐、对映体或非对映体。

[0946] 75.根据实施方案2至46以及71至74中任一项所述的药物组合，其中包含RNAi寡核苷酸和TLR7激动剂的该组合选自由以下组合组成的组：

[0947] RNAi ID NO:1和CMP ID NO:VI;RNAi ID NO:2和CMP ID NO:VI;RNAi ID NO:3和CMP ID NO:VI;RNAi ID NO:4和CMP ID NO:VI;RNAi ID NO:5和CMP ID NO:VI;RNAi ID NO:6和CMP ID NO:VI;RNAi ID NO:7和CMP ID NO:VI;RNAi ID NO:8和CMP ID NO:VI;RNAi ID NO:9和CMP ID NO:VI；

[0948] RNAi ID NO:1和CMP ID NO:VII;RNAi ID NO:2和CMP ID NO:VII;RNAi ID NO:3和CMP ID NO:VII;RNAi ID NO:4和CMP ID NO:VII;RNAi ID NO:5和CMP ID NO:VII;RNAi ID NO:6和CMP ID NO:VII;RNAi ID NO:7和CMP ID NO:VII;RNAi ID NO:8和CMP ID NO:VII;RNAi ID NO:9和CMP ID NO:VII；

[0949] RNAi ID NO:1和CMP ID NO:VIII;RNAi ID NO:2和CMP ID NO:VIII;RNAi ID NO:3和CMP ID NO:VIII;RNAi ID NO:4和CMP ID NO:VIII;RNAi ID NO:5和CMP ID NO:VIII;RNAi ID NO:6和CMP ID NO:VIII;RNAi ID NO:7和CMP ID NO:VIII;RNAi ID NO:8和CMP ID NO:VIII;RNAi ID NO:9和CMP ID NO:VIII；

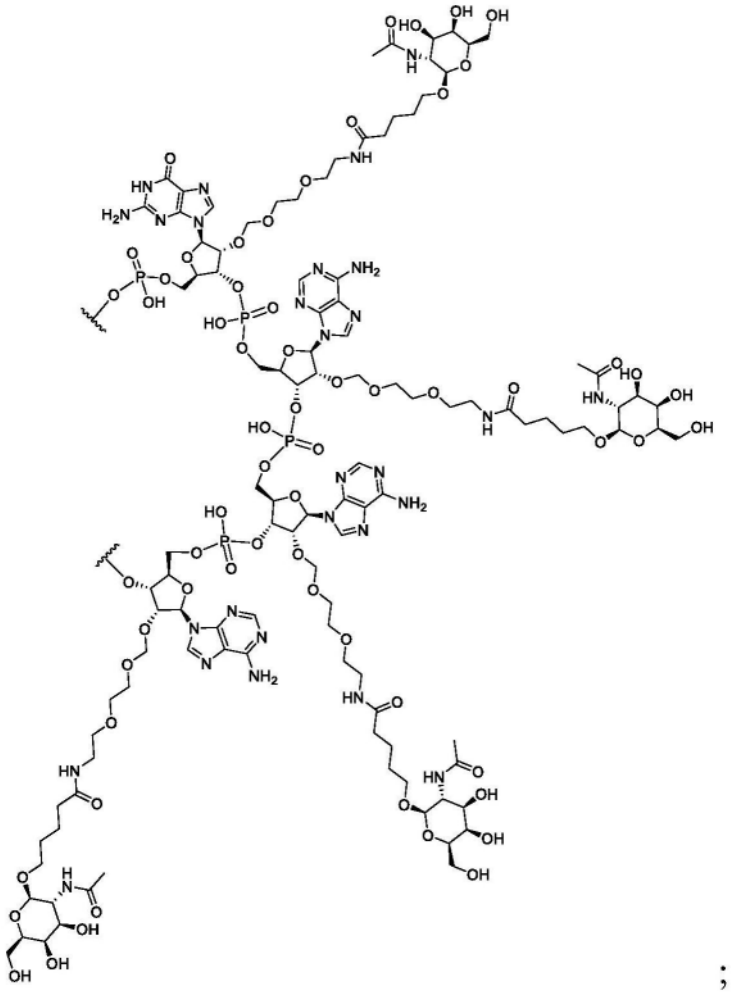
[0950] RNAi ID NO:1和CMP ID NO:XIII;RNAi ID NO:2和CMP ID NO:XIII;RNAi ID NO:3和CMP ID NO:XIII;RNAi ID NO:4和CMP ID NO:XIII;RNAi ID NO:5和CMP ID NO:XIII;RNAi ID NO:6和CMP ID NO:XIII;RNAi ID NO:7和CMP ID NO:XIII;RNAi ID NO:8和CMP ID NO:XIII;或RNAi ID NO:9和CMP ID NO:XIII；

[0951] 或其药用盐、对映体或非对映体。

[0952] 76.根据实施方案2至46以及71至74中任一项所述的药物组合，其中该RNAi寡核苷酸为RNAi ID NO:7：

[0953] 寡核苷酸，该寡核苷酸包含与反义链形成双链体区的正义链，其中：

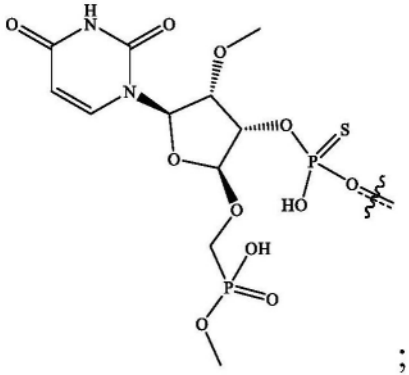
[0954] 所述正义链包含如GACAAAAAUCCUCACAAUAAGCAGCCGAAAGGCUGC(SEQ ID NO:41)所示的序列，并且包含：在第3位、第8位至第10位、第12位、第13位和第17位处的2'-氟修饰的核苷酸；在第1位、第2位、第4位至第7位、第11位、第14位至第16位、第18位至第26位和第31位至第36位处的2'-O-甲基修饰的核苷酸；以及在第1位和第2位处的核苷酸之间的一个硫代磷酸酯核苷酸间键，其中所述正义链上的所述-GAAA-序列的所述核苷酸中的每个核苷酸缀合至单价GalNac部分，其中所述-GAAA-序列包含以下结构：

[0955] 

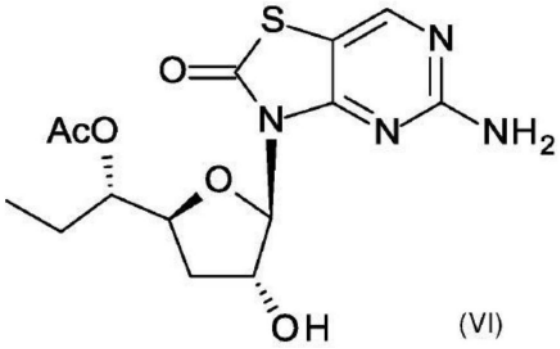
；

并且

[0956] 所述反义链包含如UUAUUGUGAGGAUUUUUGUCGG(SEQ ID NO:38)所示的序列，并且包含：在第2位、第3位、第5位、第7位、第8位、第10位、第12位、第14位、第16位和第19位处的2'-氟修饰的核苷酸；在第1位、第4位、第6位、第9位、第11位、第13位、第15位、第17位、第18位和第20位至第22位处的2'-O-甲基修饰的核苷酸；以及核苷酸1与核苷酸2之间、核苷酸2与核苷酸3之间、核苷酸3与核苷酸4之间、核苷酸20与核苷酸21之间以及核苷酸21与核苷酸22之间的五个硫代磷酸酯核苷酸间键，其中所述反义链的5'-核苷酸的糖的4'-碳具有以下结构：

[0957] 
;

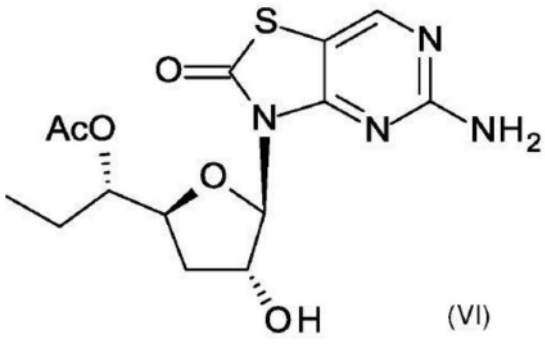
[0958] 并且所述TLR7激动剂为CMP ID NO:VI：

[0959] 
(VI)

[0960] 或其药用盐、对映体或非对映体。

[0961] 77.根据实施方案47至74中任一项所述的药物组合，其中包含GalNAc缀合的反义寡核苷酸和TLR7激动剂的该组合选自由以下组合组成的组：CMP ID NO:15_1和VI;CMP ID NO:15_2和VI;CMP ID NO:16_1和VI;CMP ID NO:20_1和VI;CMP ID NO:23_1和VI;CMP ID NO:26_1和VI;CMP ID NO:29_1和VI;CMP ID NO:15_1和VII;CMP ID NO:15_2和VII;CMP ID NO:16_1和VII;CMP ID NO:20_1和VII;CMP ID NO:23_1和VII;CMP ID NO:26_1和VII;CMP ID NO:29_1和VII;CMP ID NO:15_1和VIII;CMP ID NO:15_2和VIII;CMP ID NO:16_1和VIII;CMP ID NO:20_1和VIII;CMP ID NO:23_1和VII;CMP ID NO:26_1和VIII;CMP ID NO:29_1和VIII;CMP ID NO:15_1和XIII;CMP ID NO:15_2和XIII;CMP ID NO:16_1和XIII;CMP ID NO:20_1和XIII;CMP ID NO:23_1和XIII;CMP ID NO:26_1和XIII;以及CMP ID NO:29_1和XIII，或其药用盐、对映体或非对映体。

[0962] 78.根据实施方案47至74中任一项所述的药物组合，其中该GalNAc缀合的反义寡核苷酸为如图5所示的CMP ID NO:15_1，并且该TLR7激动剂为CMP ID NO:VI：

[0963] 
(VI)

[0964] 或其药用盐、对映体或非对映体。

[0965] 79.根据实施方案1至78中任一项所述的药物组合，其中该治疗性寡核苷酸与药用

盐一起配制。

[0966] 80.根据实施方案79所述的药物组合，其中该药用盐为金属阳离子，优选地其中该药用盐为Na^+或K^+。

[0967] 81.根据实施方案1至80中任一项所述的药物组合，其中根据实施方案1至80中任一项所述的该治疗性寡核苷酸和该TLR7激动剂与药用载体一起配制。

[0968] 82.根据实施方案81所述的药物组合，其中该药用载体为水。

[0969] 83.根据实施方案1至82中任一项所述的药物组合，其中该治疗性寡核苷酸被配制在磷酸盐缓冲盐水中。

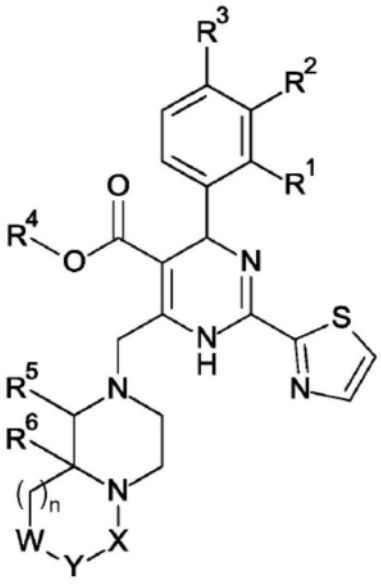
[0970] 84.根据实施方案1至83中任一项所述的药物组合，其中该治疗性寡核苷酸被配制用于皮下注射，并且该TLR7激动剂被配制用于口服施用。

[0971] 85.根据实施方案1至83中任一项所述的药物组合，其中该治疗性寡核苷酸被配制用于静脉注射，并且该TLR7激动剂被配制用于口服施用。

[0972] 86.根据实施方案2至46、75、76以及79至83中任一项所述的药物组合，其中该治疗性寡核苷酸为被配制用于皮下注射的siRNA，并且该TLR7激动剂被配制用于口服施用。

[0973] 87.根据实施方案1至86中任一项所述的药物组合，其中该药物组合包含RNAi寡核苷酸和TLR7激动剂，其中该药物组合进一步包含CpAM(核心蛋白变构调节剂)。

[0974] 88.根据实施方案87所述的药物组合，其中该CpAM具有根据如下所示的化合物(CpAM1)的式：

[0975] 

化合物 (CpAM1)

[0976] 其中

[0977] R^1为氢、卤素或C_{1-6}烷基；

[0978] R^2为氢或卤素；

[0979] R^3为氢或卤素；

[0980] R^4为C_{1-6}烷基；

[0981] R^5为氢、羟基C_{1-6}烷基、氨基羰基、C_{1-6}烷氧基羰基或羧基；

[0982] R^6为氢、C_{1-6}烷氧基羰基或羧基-C_mH_{2m}-，

[0983] X为羰基或磺酰基；

[0984] Y为-CH_2-、-O-或-N(R^7)-，

[0985] 其中R^7为氢、C_{1-6}烷基、卤代C_{1-6}烷基、C_{3-7}环烷基-C_mH_{2m}-、C_{1-6}烷氧基羰基-C_mH_{2m}-、-C_tH_{2t}-COOH、-卤代C_{1-6}烷基-COOH、-(C_{1-6}烷氧基)C_{1-6}烷基-COOH、-C_{1-6}烷基-O-C_{1-6}烷基-COOH、-C_{3-7}环烷基-C_mH_{2m}-COOH、-C_mH_{2m}-C_{3-7}环烷基-COOH、羟基-C_tH_{2t}-、羧基螺[3.3]庚基或羧基苯基-C_mH_{2m}-、羧基吡啶基-C_mH_{2m}-；

[0986] W为-CH_2-、-C(C_{1-6}烷基)$_2$-、-O-或羰基；

[0987] n为0或1；

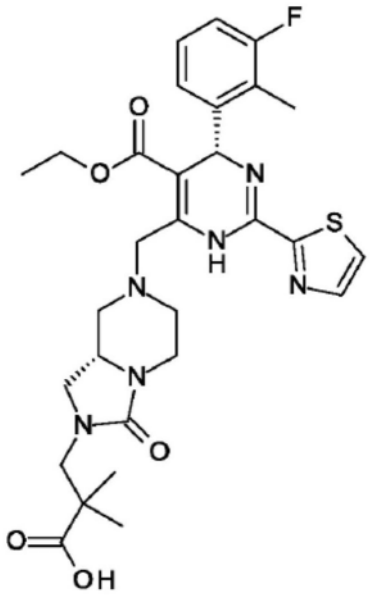
[0988] m为0至7；

[0989] t为1至7；

[0990] 或其药用盐、或对映体、或非对映体。

[0991] 89.根据实施方案87或88所述的药物组合，其中该CpAM为化合物(CpAM2)

[0992]



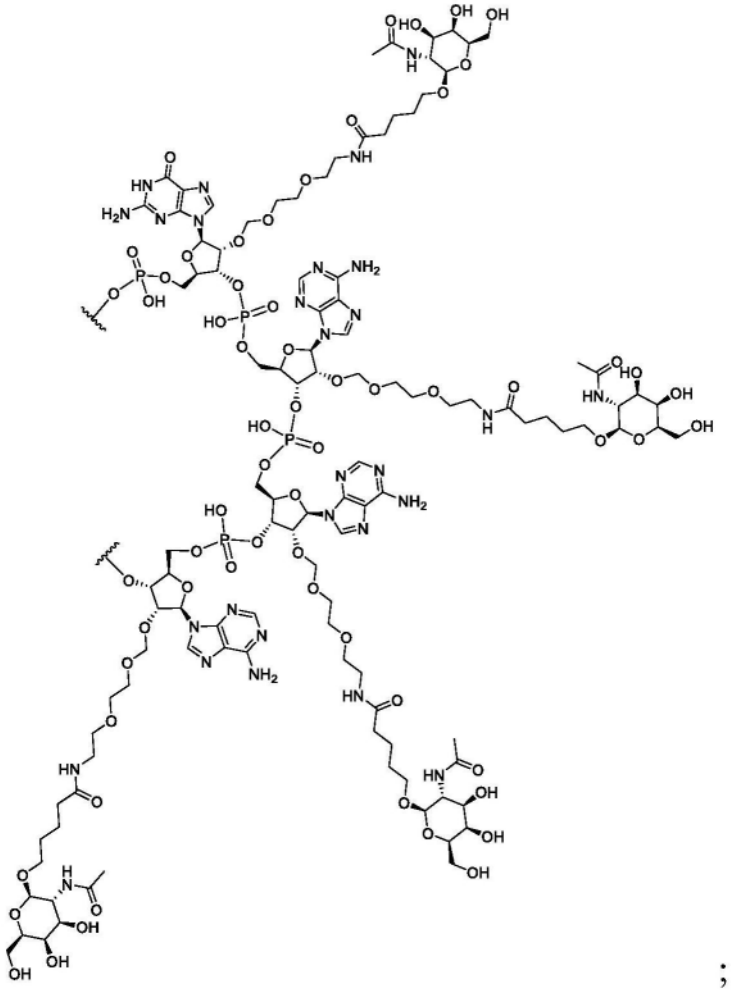
化合物 (CpAM2)

[0993] 或其药用盐、对映体或非对映体。

[0994] 90.一种药物组合，其包含RNAi寡核苷酸、TLR7激动剂和CpAM，其中该RNAi寡核苷酸为RNAi ID NO:7：

[0995] 寡核苷酸，所述寡核苷酸包含与反义链形成双链体区的正义链，其中：

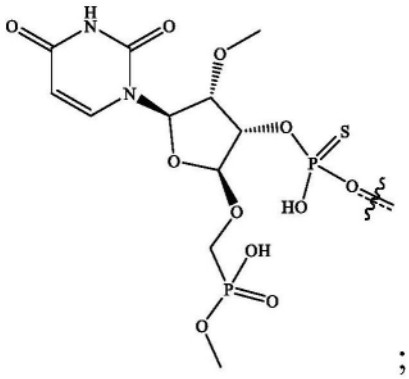
[0996] 所述正义链包含如GACAAAAAUCCUCACAAUAAGCAGCCGAAAGGCUGC(SEQ ID NO:41)所示的序列，并且包含：在第3位、第8位至第10位、第12位、第13位和第17位处的2'-氟修饰的核苷酸；在第1位、第2位、第4位至第7位、第11位、第14位至第16位、第18位至第26位和第31位至第36位处的2'-O-甲基修饰的核苷酸；以及在第1位和第2位处的核苷酸之间的一个硫代磷酸酯核苷酸间键，其中所述正义链上的所述-GAAA-序列的所述核苷酸中的每个核苷酸缀合至单价GalNAc部分，其中所述-GAAA-序列包含以下结构：

[0997] 

;

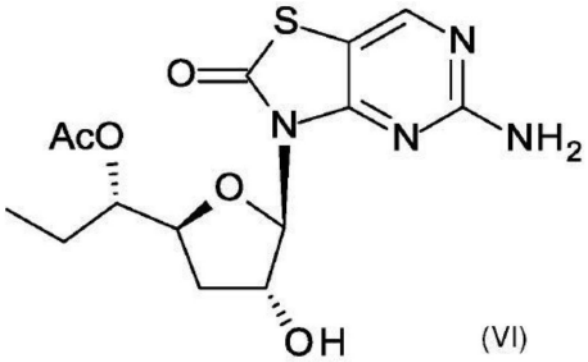
并且

[0998] 所述反义链包含如UUAUUGUGAGGAUUUUUGUCGG(SEQ ID NO:38)所示的序列,并且包含:在第2位、第3位、第5位、第7位、第8位、第10位、第12位、第14位、第16位和第19位处的2'-氟修饰的核苷酸;在第1位、第4位、第6位、第9位、第11位、第13位、第15位、第17位、第18位和第20位至第22位处的2'-O-甲基修饰的核苷酸;以及核苷酸1与核苷酸2之间、核苷酸2与核苷酸3之间、核苷酸3与核苷酸4之间、核苷酸20与核苷酸21之间以及核苷酸21与核苷酸22之间的五个硫代磷酸酯核苷酸间键,其中所述反义链的5'-核苷酸的糖的4'-碳具有以下结构:

[0999] 

;

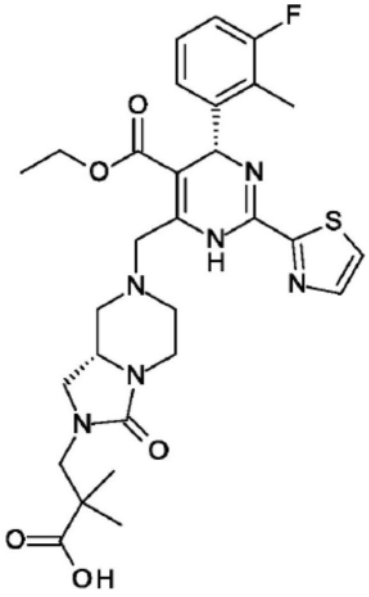
[1000] 其中该TLR7激动剂为CMP ID NO:VI:

[1001] 

(VI)

[1002] 或其药用盐、对映体或非对映体；

[1003] 并且其中所述CpAM为化合物(CpAM2)：

[1004] 

化合物 (CpAM2)

[1005] 或其药用盐、对映体或非对映体。

[1006] 91.一种药物组合物，其包含根据实施方案1至90中任一项所述的药物组合。

[1007] 92.一种组分试剂盒，其包含根据实施方案1至90中任一项所述的治疗性寡核苷酸以及包装插页，所述包装插页带有关于与TLR7激动剂一起施用以治疗乙型肝炎病毒感染的说明。

[1008] 93.根据实施方案92所述的组分试剂盒，其中在所述包装插页中提到的所述TLR7激动剂为根据实施方案1至90中任一项所述的TLR7激动剂。

[1009] 94.根据实施方案92或93所述的组分试剂盒，其中所述试剂盒包含根据实施方案1至90中任一项所述的治疗性寡核苷酸和根据实施方案1至90中任一项所述的TLR7激动剂。

[1010] 95.根据实施方案92至94中任一项所述的组分试剂盒，其中将所述治疗性寡核苷酸被配制用于皮下注射，并且所述TLR7激动剂被配制用于口服施用。

[1011] 96.根据实施方案92至95中任一项所述的组分试剂盒，其中所述包装插页描述了对慢性乙型肝炎病毒感染的治疗。

[1012] 97.根据实施方案1至96中任一项所述的药物组合、组合物或试剂盒，其中所述治

疗性寡核苷酸呈转基因的形式，所述转基因被工程化以在细胞中表达所述寡核苷酸。

[1013] 98.根据实施方案1至97中任一项所述的药物组合、组合物或试剂盒用于治疗乙型肝炎病毒感染的用途。

[1014] 99.根据实施方案98所述的用途，其中待治疗的所述乙型肝炎病毒感染为慢性乙型肝炎病毒感染。

[1015] 100.根据实施方案98或99所述的用途，其中所述治疗性寡核苷酸和所述TLR7激动剂以药学有效量施用。

[1016] 101.根据实施方案98至100中任一项所述的用途，其中所述治疗性寡核苷酸每周施用，并且所述TLR7激动剂隔日施用。

[1017] 102.根据实施方案98至101中任一项所述的用途，其中所述治疗性寡核苷酸以预施用1mg/kg至4mg/kg给药，并且所述TLR7激动剂以预施用150mg至170mg给药。

[1018] 103.根据实施方案98至102中任一项所述的用途，其中所述治疗性寡核苷酸施用48周，并且施用84剂TLR7激动剂。

[1019] 104.根据实施方案98至103中任一项所述的用途，其中所述治疗性寡核苷酸和所述TLR7激动剂的施用在同一周中开始。

[1020] 105.根据实施方案98至104中任一项所述的用途，其中所述治疗性寡核苷酸呈用于皮下施用的剂型，并且所述TLR7激动剂呈用于口服施用的剂型。

[1021] 106.根据实施方案98至105中任一项所述的用途，其中所述治疗性寡核苷酸的剂量为100mg/ml至150mg/ml，并且所述TLR7激动剂的剂量为150mg至170mg。

[1022] 107.根据实施方案98至106中任一项所述的用途，其中在没有用靶向编码HBV mRNA转录物的非表面抗原的RNAi寡核苷酸进行治疗的情况下施用所述治疗性寡核苷酸。

[1023] 108.根据实施方案98至107中任一项所述的用途，其中受试者未被施用选择性地靶向HBxAg mRNA转录物的RNAi寡核苷酸。

[1024] 109.根据实施方案98至108中任一项所述的用途，其进一步包括向所述受试者施用有效量的恩替卡韦。

[1025] 110.根据实施方案98至109中任一项所述的用途，其中所述治疗性寡核苷酸以转基因的形式递送，所述转基因被工程化以在细胞中表达所述寡核苷酸。

[1026] 111.根据实施方案1至97中任一项所述的药物组合、组合物或试剂盒，其用于医药中。

[1027] 112.根据实施方案1至97中任一项所述的药物组合、组合物或试剂盒，其用于治疗乙型肝炎病毒感染。

[1028] 113.根据实施方案111或112所述的供使用的药物组合、组合物或试剂盒，其中待治疗的所述乙型肝炎病毒感染为慢性乙型肝炎病毒感染。

[1029] 114.根据实施方案111至113中任一项所述的供使用的药物组合、组合物或试剂盒，其中所述治疗性寡核苷酸和所述TLR7激动剂以药学有效量施用。

[1030] 115.根据实施方案111至114中任一项所述的供使用的药物组合、组合物或试剂盒，其中所述治疗性寡核苷酸每周施用，并且所述TLR7激动剂隔日施用。

[1031] 116.根据实施方案111至115中任一项所述的供使用的药物组合、组合物或试剂盒，其中所述治疗性寡核苷酸以预施用1mg/kg至4mg/kg给药，并且所述TLR7激动剂以预施

用150mg至170mg给药。

[1032] 117.根据实施方案111至116中任一项所述的供使用的药物组合、组合物或试剂盒，其中所述治疗性寡核苷酸施用48周，并且施用84剂TLR7激动剂。

[1033] 118.根据实施方案111至117中任一项所述的供使用的药物组合、组合物或试剂盒，其中所述治疗性寡核苷酸和所述TLR7激动剂的施用在同一周中开始。

[1034] 119.根据实施方案111至118中任一项所述的供使用的药物组合、组合物或试剂盒，其中所述治疗性寡核苷酸呈用于皮下施用的剂型，并且所述TLR7激动剂呈用于口服施用的剂型。

[1035] 120.根据实施方案111至119中任一项所述的供使用的药物组合、组合物或试剂盒，其中所述治疗性寡核苷酸的剂量为100mg/ml至150mg/ml，并且所述TLR7激动剂的剂量为150mg至170mg。

[1036] 121.根据实施方案111至120中任一项所述的供使用的药物组合、组合物或试剂盒，其中在没有用靶向编码HBV mRNA转录物的非表面抗原的RNAi寡核苷酸进行治疗的情况下施用所述治疗性寡核苷酸。

[1037] 122.根据实施方案111至121中任一项所述的供使用的药物组合、组合物或试剂盒，其中所述受试者未被施用选择性地靶向HBxAg mRNA转录物的RNAi寡核苷酸。

[1038] 123.根据实施方案111至122中任一项所述的供使用的药物组合、组合物或试剂盒，其进一步包括向所述受试者施用有效量的恩替卡韦。

[1039] 124.根据实施方案111至123中任一项所述的供使用的药物组合、组合物或试剂盒，其中所述治疗性寡核苷酸以转基因的形式递送，所述转基因被工程化以在细胞中表达所述寡核苷酸。

[1040] 125.治疗性寡核苷酸在制备用于治疗乙型肝炎病毒感染的第一药物中的用途，其中所述第一药物为根据实施方案1至97中任一项所述的治疗性寡核苷酸，并且其中所述第一药物待与第二药物组合施用，其中所述第二药物为根据实施方案1至97中任一项所述的TLR7激动剂。

[1041] 126.根据实施方案1至97中任一项所述的药物组合、组合物或试剂盒在制备药物中的用途。

[1042] 127.根据实施方案1至97中任一项所述的药物组合、组合物或试剂盒在制备用于治疗乙型肝炎病毒感染的药物中的用途。

[1043] 128.根据实施方案125至127中任一项所述的用途，其中待治疗的所述乙型肝炎病毒感染为慢性乙型肝炎病毒感染。

[1044] 129.根据实施方案125至128中任一项所述的用途，其中所述治疗性寡核苷酸和所述TLR7激动剂以药学有效量施用。

[1045] 130.根据实施方案125至129中任一项所述的用途，其中所述治疗性寡核苷酸每周施用，并且所述TLR7激动剂隔日施用。

[1046] 131.根据实施方案125至130中任一项所述的用途，其中所述治疗性寡核苷酸以预施用1mg/kg至4mg/kg给药，并且所述TLR7激动剂以预施用150mg至170mg给药。

[1047] 132.根据实施方案125至131中任一项所述的用途，其中所述治疗性寡核苷酸施用48周，并且施用84剂TLR7激动剂。

[1048] 133.根据实施方案125至132中任一项所述的用途,其中所述治疗性寡核苷酸和所述TLR7激动剂的施用在同一周中开始。

[1049] 134.根据实施方案125至133中任一项所述的用途,其中所述治疗性寡核苷酸呈用于皮下施用的剂型,并且所述TLR7激动剂呈用于口服施用的剂型。

[1050] 135.根据实施方案125至134中任一项所述的用途,其中所述治疗性寡核苷酸的剂量为100mg/ml至150mg/ml,并且所述TLR7激动剂的剂量为150mg至170mg。

[1051] 136.根据实施方案125至135中任一项所述的用途,其中在没有用靶向编码HBV mRNA转录物的非表面抗原的RNAi寡核苷酸进行治疗的情况下施用所述治疗性寡核苷酸。

[1052] 137.根据实施方案125至136中任一项所述的用途,其中受试者未被施用选择性地靶向HBxAg mRNA转录物的RNAi寡核苷酸。

[1053] 138.根据实施方案125至137中任一项所述的用途,其进一步包括向所述受试者施用有效量的恩替卡韦。

[1054] 139.根据实施方案125至138中任一项所述的用途,其中所述治疗性寡核苷酸以转基因的形式递送,所述转基因被工程化以在细胞中表达所述寡核苷酸。

[1055] 140.一种用于治疗乙型肝炎病毒感染的方法,其包括:将治疗有效量的根据实施方案1至97中任一项所述的治疗性寡核苷酸与治疗有效量的根据实施方案1至91或实施方案94至97中任一项所述的TLR7激动剂组合施用于感染乙型肝炎病毒感染的受试者。

[1056] 141.一种用于治疗乙型肝炎病毒感染的方法,其包括:向感染乙型肝炎病毒感染的受试者施用治疗有效量的根据实施方案1至97中任一项所述的药物组合、组合物或试剂盒。

[1057] 142.根据实施方案140或141所述的方法,其中待治疗的所述乙型肝炎病毒感染为慢性乙型肝炎病毒感染。

[1058] 143.根据实施方案140至142中任一项所述的方法,其中所述治疗性寡核苷酸和所述TLR7激动剂以药学有效量施用。

[1059] 144.根据实施方案140至143中任一项所述的方法,其中所述治疗性寡核苷酸每周施用,并且所述TLR7激动剂隔日施用。

[1060] 145.根据实施方案140至144中任一项所述的方法,其中所述治疗性寡核苷酸以预施用1mg/kg至4mg/kg给药,并且所述TLR7激动剂以预施用150mg至170mg给药。

[1061] 146.根据实施方案140至145中任一项所述的方法,其中所述治疗性寡核苷酸施用48周,并且施用84剂TLR7激动剂。

[1062] 147.根据实施方案140至146中任一项所述的方法,其中所述治疗性寡核苷酸和所述TLR7激动剂的施用在同一周中开始。

[1063] 148.根据实施方案140至147中任一项所述的方法,其中所述治疗性寡核苷酸呈用于皮下施用的剂型,并且所述TLR7激动剂呈用于口服施用的剂型。

[1064] 149.根据实施方案140至148中任一项所述的方法,其中所述治疗性寡核苷酸的剂量为100mg/ml至150mg/ml,并且所述TLR7激动剂的剂量为150mg至170mg。

[1065] 150.根据实施方案140至149中任一项所述的方法,其中在没有用靶向编码HBV mRNA转录物的非表面抗原的RNAi寡核苷酸进行治疗的情况下施用所述治疗性寡核苷酸。

[1066] 151.根据实施方案140至150中任一项所述的方法,其中所述受试者未被施用选择

性地靶向HBxAg mRNA转录物的RNAi寡核苷酸。

[1067] 152.根据实施方案140至151中任一项所述的方法,其进一步包括向所述受试者施用有效量的恩替卡韦。

[1068] 153.根据实施方案140至152中任一项所述的方法,其中所述治疗性寡核苷酸以转基因的形式递送,所述转基因被工程化以在细胞中表达所述寡核苷酸。

[1069] 154.一种减少乙型肝炎病毒表面抗原在细胞中的表达的方法,所述方法包括:向所述细胞递送根据实施方案1至91中任一项所述的药物组合或组合物。

[1070] 155.根据实施方案154所述的方法,其中所述细胞为肝细胞。

[1071] 156.根据实施方案154或155所述的方法,其中所述细胞在体内。

[1072] 157.根据实施方案154或155所述的方法,其中所述细胞在体外。

[1073] 158.根据实施方案154至157中任一项所述的方法,其中所述治疗性寡核苷酸以转基因的形式递送,所述转基因被工程化以在所述细胞中表达所述寡核苷酸。

[1074] 159.一种基本上如本文并参考附图所述的药物组合、组合物、试剂盒、用途或方法。

[1075] 实例

[1076] A部分:RNAi寡核苷酸的作用

[1077] 实例A1.有效HBsAg表达寡核苷酸抑制剂的开发

[1078] HBV表面抗原被鉴定为基于RNAi的疗法的靶标以治疗HBV感染。如图20所示的HBV基因组组织中所描述的,HBsAg由从单个ORF转录的三个RNA分子编码。寡核苷酸被设计用于沉默有助于HBsAg组装的一个或多个RNA转录物的目的(在图20中用"X"表示示例性RNAi靶位点)。在体外和在体内设计并评估了HBsAg靶向寡核苷酸HBV-254。基于直接靶向四种HBV RNA种类的靶mRNA转录物的能力选择和设计了HBV-254。实验中使用的HBV-254双链体寡核苷酸包含如以下所示的序列(显示为5'至3')的正义链:GUGGUGGACUUCUCUCAAUAGCAGCCGAAAGGCUGC(SEQ ID NO:55);和如以下所示的序列的反义链(显示为5'至3'):UAUUGAGAGAAGUCCACCACGG(SEQ ID NO:56)。

[1079] 在HDI小鼠中进行了寡核苷酸HBV-254的单剂量评估,证明了皮下靶向HBsAg病毒转录物的能力(图20)。如图所示,HBV-254随着剂量的增加而全身性地降低了小鼠的HBsAg水平。在以3mg/kg皮下施用HBV-254的QW×3给药方案之后,在小鼠中进一步评估了临床前效力(图23)。施用点在图中用箭头指示。在经寡核苷酸处理的小鼠和未经处理的对照小鼠两者中监测了HBsAg水平达147天的时间跨度。在整个研究中,经处理的小鼠的HBsAg水平持续降低,其中在第一次施用之后大约两个月时,表达水平(相对于对照)似乎稳定在降低的基线处。

[1080] 使用利用未经修饰的四环形式的寡核苷酸进行的psiCHECK报告子测定法,通过体外筛选鉴定了附加的有效的HBsAg靶向寡核苷酸。来自三个不同平板的结果显示在图14中。使用基于荧光的报告子测定法,在HeLa细胞中以三种浓度(1pM、10pM和100pM)评估了每种寡核苷酸(包括HBV-254)。对于每个平板所报告的结果进一步显示为与阳性对照(8pM、40pM和200pM)、阴性对照(1nM)和模拟转染进行比较。用框突出显示的寡核苷酸被放大用于体内测试,其中发现HBV-219和HBV-258是在HBV-254和从筛选中鉴定出的那些寡核苷酸中最有效的寡核苷酸。与HBV-254相比,HBV-219在效力上表现出多log的改善,因此被选择用于附

加的评估。

[1081] 实例A2.序列保守性分析和增加整体治疗效用的工程化错配

[1082] 将实例A1中评估的几种最有效的寡核苷酸与HBV基因型A-I的基因组序列进行比较。初步保守性分析的结果列于表10中。如表所示，HBV-219在这些基因组中具有相对低的保守性百分比。然而，如果在引导链的第15位处引入错配(MM)，则保守性百分比显著增加(从66％增加至96％)。来自GenBank公共数据库的基因型乙型肝炎病毒(HBV)序列数据(通过引用并入本文)用于生物信息学的管理和比对。

[1083] 表10.用顶端HBV序列进行的初步保守性分析

[1084]

寡核苷酸	具有以**粗体**显示的 MM 的引导链	跨基因组的保守性%	耐受 MM 的情况下的保守性%
HBV-0217	UUUGUGAGGAUU**U**UUGUCAAGG	66	97
HBV-0219	UUAUUGUGAGGAUU**U**UUGUCGG	66	96
HBV-0254	U**C**UGAGAGAAGUCCACCACGGG	94	98
HBV-0255	UA**C**UGAGAGAAGUCCACCACGG	95	99
HBV-0258	UAAAA**C**UGAGAGAAGUCCACGG	94	98

[1085] 进行了后续保守性分析，其重点在于表10中的几种寡核苷酸并且涉及更广泛的检索参数。例如，尽管初步分析包括仅全长基因组序列，但是重点分析包括全长序列和部分(与靶位点具有>80％的同一性)序列。另外，检查的基因组的数量从初步分析中的5,628个基因组增加至重点分析中的多于17,000个基因组。来自重点分析的结果与初步分析中观察到的趋势基本一致(表11)。如表所示并且进一步在图15中示出，预测HBV-219对HBV基因型B、E、F、H和I无活性，除非耐受引导链第15位处的错配。

[1086] 表11.重点保守性分析

[1087]

		HBV-219	**HBV-254**	**HBV-258**
	ORF 靶标	S	S	S
	正义 19-mer	GACAAGAATCCTCACAATA	CGTGGTGGACTTCTCTCAA	GTGGACTTCTCTCAATTTT
	正义 19-mer w/模糊碱基	GACAA**N**AATCCTCACAATA	CGTGGTGGACTTCTCTCA**N**	GTGGACTTCTCTCA**N**TTTT
	错配的引导位置	15	2	6
基因型保守性*	基因型 A	97/99 [3278]	94/97 [4002]	94/97 [4005]
	基因型 B	**03**/95 [2563]	**81**/97 [2700]	**82**/99 [2700]
	基因型 C	92/97 [4783]	95/97 [4938]	96/98 [4938]
	基因型 D	95/97 [4311]	96/99 [4395]	96/98 [4398]
	基因型 E	**01**/98 [1039]	93/95 [1234]	93/95 [1232]
	基因型 F	**01**/90 [425]	94/96 [501]	95/96 [501]
	基因型 G	92/99 [83]	98/98 [85]	99/99 [85]
	基因型 H	**03**/92 [71]	**86**/97 [78]	**87**/99 [78]
	基因型 I	**00**/100 [18]	95/100 [22]	95/100 [22]
	总计(重点分析)	**72**/97 [17021]	93/97 [17995]	93/98 [17959]

[1088]

总计(初步分析)	***66**/96 [5628]*	*94/98 [5628]*	*94/98 [5628]*

[1089] *以(完美匹配/MM)报告的保守性分析，其中<90％的值以粗体显示；[总计N#]

[1090] 利用了psiCHECK-2双荧光素酶报告子系统来评估在HBV-217、HBV-219、HBV-254、HBV-255和HBV-258中的每一者中的选定位置处的错配的作用。psiCHECK介体使得能够监测与报告子基因融合的靶基因的表达的变化，其中活性RNAi降解融合构建体以产生对应的报告子信号的下降。图16中的图表概括地描述了在这些测定中所使用的介体。亲本部分报告子序列包含在S ORF中感兴趣靶位点周围来自基因型A(GenBank:AM282986.1)的120个碱基对片段。亲本寡核苷酸双链体序列在图16所示的对应位点处与报告子质粒具有100％同源性，而错配寡核苷酸双链体序列与报告子质粒具有单个错配。图17中示出了与对应的亲本部分报告子序列比对的所测试的寡核苷酸的亲本序列和错配序列。

[1091] 对于示例性错配测定，所测试的寡核苷酸包含相同的修饰模式。根据针对图17中的每个寡核苷酸显示的编号方案，修饰如下：在第1位处的5'-甲氧基,膦酸酯-4'-氧基-2'-O-甲基尿苷；在第2位、第3位、第5位、第7位、第8位、第10位、第12位、第14位、第16位和第19位处的2'-氟修饰的核苷酸；在第1位、第4位、第6位、第9位、第11位、第13位、第15位、第17位、第18位和第20位至第22位处的2'-O-甲基修饰的核苷酸；以及在第1位和第2位处的核苷酸之间、在第2位与第3位处的核苷酸之间、在第3位与第4位处的核苷酸之间、在第20位与第21位处的核苷酸之间以及在第21位与第22位处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键。错配的位置对于每个亲本和错配组是不同的，并且在图17的框中显示。

[1092] 使用在HeLa细胞中转染的以1nM开始的6点、5倍系列稀释历经3天的时间段对每种寡核苷酸进行了psiCHECK2报告子测定。在第1天，将10,000个HeLa细胞/孔(96孔)接种到黑壁透明底部的平板(80％至90％融合)中。在第2天，将介体DNA和RNAi分子在无血清的适量Opti-MEM® I培养基中稀释并轻轻混合。轻轻混合之后，对于每个反应，将0.2μL Lipofectamine® 2000稀释到25μL无血清的Opti-MEM® I培养基中。将稀释液轻轻混合，并在室温下孵育5分钟。孵育5分钟之后，将等体积的稀释的DNA和RNAi分子与稀释的Lipofectamine® 2000合并。将合并的混合物轻轻混合，并在室温下孵育20分钟，以允许复合物形成发生。随后，将DNA-RNAi分子-Lipofectamine® 2000复合物添加到包含细胞和培养基的每个孔中，并通过前后摇动平板轻轻混合。然后将细胞在CO_2培养箱中于37℃孵育，直至准备好收获细胞并测定靶基因。在第3天，将100μL Dual-Glo试剂添加到每个孔中，混合并孵育10分钟，然后读取发光。进一步向每个孔中添加100μL Dual-Glo Stop&Glo，混合并孵育10分钟，然后读取发光。为每种亲本和错配寡核苷酸生成了剂量-应答曲线，以评估错配对活性的影响。表12中显示了针对每种寡核苷酸确定的EC_{50}s值以及附加说明。

[1093] 表12.HBsAg靶向寡核苷酸的错配评估

[1094]

	HBV-217	HBV-219	HBV-254	HBV-255	HBV-258
ORF 靶标	S	S	S	S	S
正义 19-mer	TGTTGACA AGAATCCT CACAAT	GACAAGA ATCCTCAC AATA	CGTGGTGG ACTTCTCT CAA	TCGTGGTG GACTTCTC TCAAT	GTGGACTT CTCTCAAT TTT
正义 19-mer w/模糊碱基	TGTTGACA ANAATCCT CACAAT	GACAANA ATCCTCAC AATA	CGTGGTGG ACTTCTCT CAN	TCGTGGTG GACTTCTC TCANT	GTGGACTT CTCTCANT TTT
错配的引导位置	13	15	2	3	6
亲本 EC_{50}s (pM)	20	5	37	35	10
MM EC_{50}s (pM)	25	8	96	366	>1000

[1095] 如通过相对EC_{50}s值所证明的,HBV-219双链体的体外剂量-应答曲线显示在引导链的第15位处具有单个错配的情况下没有丧失活性。后续体内分析比较了HBV-219亲本(本文命名为HBV(s)-219P1)和错配寡核苷酸(本文命名为HBV(s)-219P2),确认错配的引入不会引起活性的丧失(图18)。如图19所描绘的单剂量滴定曲线所示,在施用之后历经70天的时间段体内耐受HBV-219错配寡核苷酸双链体(HBV(s)-219P2)。

[1096] 图20示出了具有并入的错配的HBV-219(本文命名为HBV(s)-219)的修饰的双链体结构的实例。根据针对图17中的每种寡核苷酸显示的编号方案,正义链跨越核苷酸1至核苷酸36,并且反义链跨越寡核苷酸1至寡核苷酸22,反义链以从右到左的方向编号显示。双链体形式显示为在正义链的第36位处和反义链的第1位处的核苷酸之间具有切口。正义链中的修饰如下:在第3位、第8位至第10位、第12位、第13位和第17位处的2'-氟修饰的核苷酸;在第1位、第2位、第4位至第7位、第11位、第14位至第16位、第18位至第26位以及第31位至第36位处的2'-O-甲基修饰的核苷酸;在第1位和第2位处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键;在第27位至第30位处的2'-OH核苷酸;在第27位处的2'-氨基二乙氧基甲醇-胍基-GalNAc;以及在第28位、第29位和第30位中的每一者处的2'-氨基二乙氧基甲醇-腺嘌呤-GalNAc。反义链中的修饰如下:在第1位处的5'-甲氧基,膦酸酯-4'-氧基-2'-O-甲基尿苷硫代磷酸酯;在第2位、第3位、第5位、第7位、第8位、第10位、第12位、第14位、第16位和第19位处的2'-氟修饰的核苷酸;在第1位、第4位、第6位、第9位、第11位、第13位、第15位、第17位、第18位以及第20位至第22位处的2'-O-甲基修饰的核苷酸;以及在第1位和第2位处的核苷酸之间、第2位和第3位处的核苷酸之间、第3位和第4位处的核苷酸之间、第20位和第21位处的核苷酸之间以及第21位第22位处核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键。反义链包含在第15位处的并入的错配。也如图所示,双链体的反义链包含跨越第21位至第22位的"GG"突出端。

[1097] 表13中示出了关于HBV(s)-219和以上提及的两种前体(HBV(s)-219P1和HBV(s)-219P2)的细节。

[1098] 表13.HBV(s)-219和前体

[1099]

RNAi 寡核苷酸	长度（正义/反义）	序列/化学修饰
HBV(s)-219	36/22mer	包含反义链第 15 处的错配。使用基于乙缩醛的 GalNAc 接头。在反义链的第 1 位处使用甲氧基，膦酸酯-4'氧基-2'-O-甲基尿苷 (MeMOP)。参见图 20 和图 29A
HBV(s)-219P2	36/22mer	包含反义链第 15 处的错配。基于点击化学的缀合并入基于三唑的 GalNAc 接头。在反义链的第 1 位处使用完全脱保护的

[1100]

		5'-膦酸酯-4'氧基-2'-O-甲基尿苷 (MOP)。参见图 29B
HBV(s)-219P1	36/22mer	不包含反义链第 15 位处的错配。与 HBV(s)-219P2 相同的化学修饰。

[1101] 实例A3:HBV(s)-219前体的抗病毒活性

[1102] 评估了用HBV(s)-219前体进行治疗对HBV核心抗原(HBcAg)的亚细胞定位的影响。使NOD_{scid}小鼠经受了HBV基因组的头尾二聚体流体动力注射(HDI)。HDI后2周开始用寡核苷酸治疗。处理后从小鼠分离的肝细胞的免疫组织化学染色显示了HBV核心抗原(HBcAg)表达的急剧下降。

[1103] 执行了RNA测序以检查HBsAg敲低对HBV病毒转录物的整体表达的影响。三次剂量(每周一次,每次3mg/kg)之后四天从HDI小鼠分离出了肝细胞。从肝细胞提取出了总RNA,并使用HiSeq平台使其经受Illumina测序。图21B描绘了RNA测序结果,其中将检测到的RNA转录物序列相对HBV RNA进行映射。还描绘了HBV(s)-219及其前体的靶位点,表明寡核苷酸靶向pgRNA(3.5kb)、S1(2.4kb)和S2(2.1kb)转录物。结果表明,与媒介物对照相比,用HBV(s)-219P1处理导致所有HBV病毒转录物的沉默率都大于90%。

[1104] 在两种不同的HBV小鼠模型中(一种是cccDNA依赖性HDI模型,而另一种是cccDNA非依赖性AAV模型)检查了HBV(s)-219P1寡核苷酸的持续作用。在HBV的HDI模型中,相比于媒介物对照和靶向HBxAg mRNA的RNAi寡核苷酸,在涉及三次剂量(每周一次,剂量为3mg/ml)的靶向HBsAg mRNA的HBV(s)-219P1寡核苷酸的处理的背景下,执行了HBsAg mRNA表达的时程(12周)分析(图22A)。HBV(s)-219P1寡核苷酸引起了≥3.9log减少,其中活性持续时间相对长,持续大于7周;然而相比之下,HBV(x)靶向寡核苷酸引起了约3.0log减少,持续了较短的时间。

[1105] 在AAV-HBV模型中,相比于媒介物对照和靶向HBxAg mRNA的RNAi寡核苷酸,在涉及三次剂量(每周一次,剂量为3mg/kg)的靶向HBsAg mRNA的HBV(s)-219P2寡核苷酸的处理的背景下,执行了另外的HBsAg mRNA表达的时程(12周)分析(图22B)。在该模型中,HBV(s)-219P2寡核苷酸引起的log减少和持续时间与HBV(x)靶向寡核苷酸相当。图22A和图22B中使用的靶向HBxAg mRNA的RNAi寡核苷酸具有UGCACUUCGCGUCACCUCUAGCAGCCGAAAGGCUGC的正义链序列和UAGAGGUGACGCGAAGUGCAGG的反义链序列。该靶向HBxAg的RNAi寡核苷酸在本文中被命名为GalXC-HBVX。

[1106] 执行了免疫组织化学染色,以相比于如上所述的媒介物对照和靶向HBxAg mRNA的

RNAi寡核苷酸,检查在用如上所述的靶向HBsAg mRNA的HBV(s)-219前体寡核苷酸处理之后从AAV-HBV模型和HBV的HDI模型获得的肝细胞中HBcAg的亚细胞分布。(图23)在HDI模型中,处理后的残留核心蛋白(HBcAg)在该两种RNAi寡核苷酸之间在亚细胞定位方面表现出显著差异,但在AAV模型中则并非如此。

[1107] 实例A4:在PXB-HBV嵌合人类肝脏模型基因型C中评估HBV(s)-219P1

[1108] 在PXB-HBV模型中评估了HBV(s)-219P1的抗病毒活性,该模型在HBV文献中也被称为嵌合人类肝脏模型。该技术基于将人类肝细胞移植到免疫严重减弱的小鼠中,然后使用遗传机制毒化宿主鼠肝细胞(Tateno等人,2015)。该过程导致小鼠包含衍生自>70%人类组织的肝脏,与野生型小鼠不同,它可以被HBV感染(Li等人,2014)。PXB-HBV模型在HBV(s)-219药理学的背景下具有多种用途:(1)确认寡核苷酸可在体内参与人类RNAi机器(RISC),(2)确认GalNAc靶向配体构型可在体内经由人类ASGR内化到肝细胞中,以及(3)在真实的HBV感染模型(与工程化的HBV表达模型相对)中确认效力。尽管存在移植的人类肝细胞导致不规则的嵌合肝脏生理机能这一局限性(Tateno等人,2015),但在该模型中可观察到显著的抗病毒效力。

[1109] 在小鼠最初感染HBV基因型C之后大约8周,收集每只小鼠的血浆作为基线HBsAg衡量。然后,9只小鼠的群组各自(对于PK,n=3,对于PD,n=6)接受3次SC注射,每周一次SC注射0(PBS)或3mg/kg HBV(s)-219P1。给药的第一天视为第0天。每周执行了非终末采血以确定每只小鼠中的血清HBsAg和循环HBV DNA水平(图24A至图24D)。在第28天对小鼠实施了安乐死达到终末组织终点。对第28天的肝样品进行肝内HBV DNA和cccDNA水平分析。在对用HBV(s)-219P1处理的小鼠分析的所有终点中都观察到了显著的抗病毒活性,包括HBsAg减少>80%,以及循环HBV DNA、肝内HBV DNA和cccDNA显著降低(图24A至图24D)。这些数据证明,在全身性施用之后,HBV(s)-219处理可在感染的人类肝细胞中产生抗病毒活性。

[1110] 实例A5:HBV(s)-219P2增强恩替卡韦的抗病毒活性

[1111] 当前的标准护理核苷(酸)类似物(例如,恩替卡韦)可有效减少循环HBV基因组DNA,但不减少循环HBsAg。尽管这在这种治疗中导致受控制的病毒血症,但是需要终生治疗并且很少实现功能性治愈。靶向S抗原的RNAi寡核苷酸会影响病毒聚合酶和HBsAg蛋白两者。在该研究中,在表达HBV的小鼠(HDI模型)中针对抗病毒活性探索了HBV(s)-219P2作为单一疗法以及与恩替卡韦的组合治疗的组合作用。

[1112] 每天向小鼠施用500ng/kg恩替卡韦(ETV)的口服剂量,持续14天。单次皮下施用了HBV(s)-219P2。通过qPCR测量了循环病毒载量(HBV DNA)(图25A),通过ELISA测量了血浆HBsAg水平(图25B),并且通过qPCR测量了肝脏HBV mRNA和pgRNA水平。在具有HBV(s)-219P2和ETV的组合疗法中观察到明显的累加作用。结果表明,单独的ETV疗法对循环HBsAg或肝脏病毒RNA未显示出效力。此外,如通过HBsAg或HBV RNA测量的HBV(s)-219P2的抗病毒活性不受ETV的共同给药的影响(图25B至图25C)。

[1113] 如图25A至图25C所示,每天给药500ng/kg PO的恩替卡韦持续14天的单一疗法导致血浆中检测到的HBV DNA相对于PBS处理的小鼠平均降低约1.6log(n=6)。在循环HBsAg或肝病毒RNA中均未观察到明显降低。在第0天单个1mg/kg或3mg/kg SC剂量的HBV(s)-219P2的单一疗法导致血浆中检测到的HBV DNA相对于PBS分别降低平均约0.8log或约1.8log(n=7)。在第0天单个6mg/kg SC剂量的HBV(s)-219P2的单一疗法导致血浆中的HBV

DNA降低平均约2.5log,并且两只小鼠中的水平降至检测限以下(n＝7)。在第0天单个SC剂量的HBV(s)-219P2的单一疗法导致循环HBsAg以及肝病毒RNA两者的剂量依赖性降低。每天给药500ng/kg PO恩替卡韦持续14天与第0天单个1mg/kg SC剂量的HBV(s)-219P2的组合疗法导致血浆中检测到的HBV DNA累加减少平均约2.3log。与在单个1mg/kg SC剂量的HBV(s)-219P2的单一疗法中观察到的血浆HBsAg和肝病毒转录物的水平降低相似,表明在减少血浆HBV DNA而不是循环HBsAg或肝病毒转录物方面具有累加性。

[1114] 实例A6.HBV(s)-219P2和GalXC-HBVX的抗病毒活性的比较

[1115] 在该研究中,向表达HBV的小鼠(HDI模型)施用了HBV(s)-219P2、GalXC-HBVX(与图22A和图22B中所使用的GalXC-HBVX相同的序列)、或该两种RNAi寡核苷酸的组合,并且给药后两周或九周监测了血浆HBsAg水平。如图26B所示,在用单个饱和的9mg/kg SC剂量的HBV(s)-219P2、GalXC-HBVX或两者的组合治疗后2周观察到了相似的HBsAg抑制水平。在用S靶向HBV(s)-219P2治疗处理的小鼠中观察到了HBsAg的时间延长的抑制,而用GalXC-HBVX或两者的组合处理的小鼠在处理后9周具有显著的HBsAg恢复(n＝3)。

[1116] 还在接受HBV(s)-219P2、GalXC-HBVX或该两种RNAi寡核苷酸的组合的小鼠中评估了在表达HBV的小鼠中HBV核心抗原(HBcAg)的亚细胞定位。用单个饱和剂量(9mg/kg,s.c.)的HBV(s)-219P2、GalXC-HBVX或1:1组合处理了表达HBV的小鼠(HDI模型)。在图27A所示的时间点处,对肝脏切片进行了HBcAg染色;显示了代表性的肝细胞。用HBV(s)-219P2作为单一疗法或与GalXC-HBVX组合处理的群组的特征为细胞核HBcAg。用仅GalXC-HBVS处理的群组仅显示出HBcAg的胞质定位,据报道其是治疗应答的有利预后指标(Huang等人J.Cell.Mol.Med.2018)。每只动物中具有核染色的HBcAg阳性细胞的百分比显示在图27B中(n＝3/组,给药后2周,每只动物计数50个细胞)。为了确认对HBcAg亚细胞定位的影响是由于HBV转录组的区域而不是由于RNAi序列的未知特性引起的,设计并测试了靶向X和S开放阅读框内的另选序列(参见图27C)。在图27C中使用了HBV-254。HBV-254的序列描述于实例A1中。图27C中所使用的靶向HBxAg的另选寡核苷酸具有GCACCUCUCUUUACGCGGAAGCAGCCGAAAGGCUGC的正义链序列和UUCCGCGUAAAGAGAGGUGCGG的反义序列。与图26B中所使用的RNAi寡核苷酸相比,该两种另选RNAi寡核苷酸具有在S抗原或X抗原中不同的RNAi靶序列。然而,它们表现出对血浆水平HBcAg相同的差异作用,表明该作用对靶向S抗原本身具有特异性,但对所使用的寡核苷酸没有特异性。

[1117] 实例A7评估键康人类受试者中的安全性、耐受性以及HBV(s)-219在HBV患者中的效力。

[1118] 该研究被设计为评估健康受试者(A组)中的安全性和耐受性以及HBV(s)-219在HBV患者中的效力(B组)。按群组剂量信息显示在图28中。HBV(s)-219的分子结构如图20、图29A所示,并且也如下所示:

[1119] 正义链:5′mG-S-mA-fC-mA-mA-mA-mA-fA-fU-fC-mC-fU-fC-mA-mC-mA-fA-mU-mA-mA-mG-mC-mA-mG-mC-mC-[ademG-GalNAc]-[ademA-GalNAc]-[adema-GalNAc]-[ademA-GalNAc]-mG-mG-mC-mU-mG-mC 3′

[1120] 杂交至:

[1121] 反义链:5′[MePhosphonate-4O-mU]-S-fU-S-fA-S-mU-fU-mG-fU-fG-mA-fG-mG-fA-mU-fU-mU-fU-mU-mG-fU-mC-S-mG-S-mG 3′

[1122] 图例：

[1123] mX:2′-O-甲基核糖核苷酸

[1124] fX:2′-氟-脱氧核糖核苷酸

[1125] [ademA-GalNAc]:2′-修饰的-GalNAc腺苷

[1126] [ademG-GalNAc]:2′-修饰的-GalNAc鸟苷

[1127] [甲氧基膦酸酯-4O-mU]:4′-O-单甲基膦酸酯-2′-O-甲基尿苷

[1128] 接头:“-”表示磷酸二酯

[1129] “-S-”表示硫代磷酸酯

[1130] 患者选择标准如下所示。

[1131] A组-健康受试者

[1132] 纳入标准：

[1133] 1.签署知情同意书时年龄为18岁(或法定许可年龄,以较大者为准)至65岁(含)。

[1134] 2.在筛选时通过医学评估(包括病史、体格检查和实验室测试)确定明显健康。

[1135] a.无持续性疾病的症状

[1136] b.在体温、脉搏、呼吸频率、血压方面无临床显著异常

[1137] c.无临床显著心血管或肺部疾病,且无需要药物治疗的心血管或肺部疾病。

[1138] 3.研究人员认为在筛选时和第-1天12导联心电图(ECG)在正常范围内或无临床显著异常

[1139] 4.在筛选访视1和准入时(第-1天)酒精或药物滥用的筛选呈阴性

[1140] 5.在筛选访视1之前至少5年为非吸烟者,且在筛选访视1时尿可替宁浓度呈阴性

[1141] 6.体重指数(BMI)在18.0-32.0kg/m^2(含)范围内。

[1142] 7.男性或女性：

[1143] a.男性参与者：

[1144] 男性参与者必须同意在治疗期间以及研究干预的给药之后至少两周期间采取避孕措施,并且在此期间不捐献精子。

[1145] b.女性参与者：

[1146] 如果女性参与者未怀孕、未哺乳,并且符合以下条件中的至少一个条件,则有资格参与:不是有生育能力的女性(WOCBP),或者,取决于地区;同意从筛选后研究登入开始持续整个治疗时期并在研究干预的给药之后历经至少12周遵循避孕指导的WOCBP。

[1147] 8.能够给出签署的包含遵守要求和限制的知情同意书1。

[1148] 排除标准,A组

[1149] 1.可能干扰研究药品的吸收、分布或消除或者干扰该研究中的临床和实验室评估的任何医疗状况历史,包括(但不限于):慢性或复发性肾脏疾病、功能性肠病(例如,频繁的腹泻或便秘)、胃肠道疾病、胰腺炎、癫痫发作、粘膜皮肤病或肌肉骨骼病、自杀未遂史或有自杀意念、或者临床上显著的抑郁症或需要药物干预的其他神经精神病

[1150] 2.高血压控制不良或不稳定;或筛选时持续收缩压>150mmHg或舒张压>95mmHg

[1151] 3.用胰岛素或降糖剂治疗的糖尿病病史

[1152] 4.在之前12个月内需要住院的哮喘病史

[1153] 5.通过中心研究实验室的筛选结果确定的G-6-PD缺乏症的证据

[1154] 6.当前的内分泌病症控制不良，甲状腺病症(甲状腺功能亢进/甲状腺功能减退等)除外，其中任何经药物治疗的甲状腺病症均不包括在内

[1155] 7.如果参与者的恶性肿瘤在之前三年期间在无附加的医疗或手术干预的情况下已经通过化学疗法完全缓解，则允许存在恶性肿瘤病史

[1156] 8.多种药物过敏史或者对寡核苷酸或GalNAc的过敏反应史

[1157] 9.SC注射不耐受史，或者可能潜在地阻碍研究干预施用或局部耐受性评估的显著腹部瘢痕

[1158] 10.临床上相关的手术史

[1159] 11.之前3年内持续乙醇滥用(>40gm乙醇/天)或非法药品使用史。

[1160] 12.研究干预施用之前7天内的临床重大疾病

[1161] 13.研究干预施用之前2个月内捐献大于500mL的血液，或筛选之前7天内捐献血浆

[1162] 14.筛选时正在发生的重大感染或已知的炎性过程(研究人员认为)

[1163] 15.慢性或复发性尿路感染(UTI)病史，或筛选之前一个月内的UTI

[1164] 16.计划在该研究进行期间进行选择性外科手术

[1165] 17.在研究干预施用之前4周内使用处方药

[1166] 18.在首次给药的7天内使用非处方(OTC)药物或草药补充剂(常规维生素除外)，除非研究人员和主办者认可在临床上不相关

[1167] 19.在给药之前3个月内已接受研究药剂，或处于研究入组之前的另一项临床研究的随访中。

[1168] 20.在筛选时HBV、HIV、HCV或HDV抗体呈血清反应阳性(如果历史测试是在筛选之前3个月内执行的，则可使用该历史测试)

[1169] 21.在筛选访视时或准入时(第-1天)丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、γ-谷氨酰转移酶(GGT)、总胆红素、碱性磷酸酶(ALP)或白蛋白超出参考范围。

[1170] 22.研究人员认为临床上相关且不可接受的全血细胞计数测试异常；血红蛋白<12.0g/dL(相当于120g/L)；血小板超出正常范围。

[1171] 23.血红蛋白A1C(HbA1C)>7％

[1172] 24.研究人员认为临床上显著且不可接受的任何其他安全性实验室测试结果

[1173] 25.从进入临床研究中心之前48小时直到研究结束，已经经历或计划经历运动水平的显著变化。

[1174] 26.研究人员认为使参与者不适合入组或者可能干扰研究的参与或完成的任何状况。

[1175] 患有乙型肝炎的B组成年人

[1176] 纳入标准，B组

[1177] 1.签署知情同意书时年龄为18岁(或法定许可年龄，以较大者为准)至65岁(含)。

[1178] 2.慢性乙型肝炎感染，记录为：

[1179] a.基于符合的临床信息符合CHB的临床病史，以及HBsAg和可能的其他HBV血清学标志物(HBeAg,HBV DNA)的先前血清阳性结果

[1180] b.筛选时HBeAg阳性患者的血清HBsAg>1000IU/mL，或者HBeAg阴性患者>500IU/mL

[1181] c.筛选时如在中心研究实验室通过TaqMan™ HBV DNA v2.0测定确定的未接受过

治疗的患者的血清HBV DNA>20,000IU/mL

[1182] d.血清IgM抗HBc阴性

[1183] 3.符合代偿性肝脏疾病且无肝硬化证据的临床病史：

[1184] a.无食管或胃肠道静脉曲张出血史

[1185] b.无腹水史

[1186] c.无因慢性肝脏疾病引起的黄疸病史

[1187] d.无肝性脑病史

[1188] e.无门静脉高血压引起的身体红斑(蜘蛛血管瘤等)

[1189] f.无表明肝硬化的先前肝脏活检、肝成像研究或弹性成像结果

[1190] 4.未接受过治疗的乙型肝炎:无具有令人满意的耐受性和依从性的先前针对乙型肝炎的抗病毒疗法(无先前包含HBV核苷(酸)或干扰素的治疗)或筛选访视之前持续至少12周的核苷(酸)疗法(恩替卡韦或替诺福韦)

[1191] 5.血清ALT>60U/L(男性)或38U/L(女性)(2x ULN,American Association for the Study of Liver Diseases(AASLD)HBV guidance criteria,Terrault等人,2016)

[1192] 6.在筛选和第-1天时,12导联ECG无临床显著异常(研究人员认为)

[1193] 7.无其他已知的肝脏疾病病因

[1194] 8.除了控制良好的高血压和对高胆固醇血症的他汀类药物管理外,无其他需要持续性医疗管理或者长期或反复药理干预的医学病症

[1195] 9.BMI在18.0-32.0kg/m^2(含)范围内

[1196] 10.男性或女性

[1197] a.男性参与者：

[1198] 男性参与者必须同意在治疗期间以及研究干预的最后一次给药之后至少12周期间采取避孕措施并且在此期间不捐献精子。

[1199] b.女性参与者：

[1200] 如果女性参与者未怀孕、未哺乳,并且符合以下条件中的至少一个条件,则有资格参与:不是WOCBP或者,取决于地区。同意在治疗时期期间并在研究干预的给药之后历经至少12周遵循避孕指导的WOCBP。

[1201] 11.能够给出签署的包含遵守要求和限制的知情同意书。

[1202] 排除标准,B组

[1203] 1.可能干扰研究药品的吸收、分布或消除或者干扰该研究中的临床和实验室评估的任何医疗状况历史,包括(但不限于):慢性或复发性肾脏疾病、功能性肠病(例如,频繁的腹泻或便秘)、胃肠道疾病、胰腺炎、癫痫发作、粘膜皮肤病或肌肉骨骼病、自杀未遂史或有自杀意念、或者临床上显著的抑郁症或需要药物干预的其他神经精神病

[1204] 2.高血压控制不良或不稳定

[1205] 3.用胰岛素或降糖剂治疗的糖尿病病史

[1206] 4.在之前12个月内需要住院的哮喘病史

[1207] 5.通过中心研究实验室的筛选结果确定的G-6-PD缺乏症的证据

[1208] 6.当前的内分泌病症控制不良,甲状腺病症(例如,甲状腺功能亢进/甲状腺功能减退等)除外,其中任何经药物治疗的甲状腺病症均不包括在内

[1209] 7.慢性或复发性UTI病史,或筛选之前一个月内的UTI

[1210] 8.HCC病史

[1211] 9.如果患者的恶性肿瘤在之前三年期间已经通过化学疗法完全缓解并且无附加的医疗或手术干预,则允许存在HCC以外的恶性肿瘤病史

[1212] 10.之前3年内持续乙醇滥用(>40gm乙醇/天)或非法药品使用史。

[1213] 11.SC注射不耐受史,或者可能潜在地阻碍研究干预施用或局部耐受性评估的显著腹部瘢痕。

[1214] 12.在疗法之前的最后6周中接受输血或通过试验后随访的预期输血。

[1215] 13.筛选之前2个月内捐献或损失>500mL的血液,或筛选之前7天内捐献血浆

[1216] 14.在筛选的3个月内的抗病毒疗法(恩替卡韦或替诺福韦除外)或最近3年内用干扰素治疗。

[1217] 15.在最近6个月内使用(或预期需要)抗凝剂、全身施用的皮质类固醇、全身施用的免疫调节剂或全身施用的免疫抑制剂。

[1218] 16.PI或主办者认为会干扰研究行为的在研究干预施用之前14天内的处方药的使用。不会全身性吸收的外用产品、他汀类药物(瑞舒伐他汀除外)、高血压药物、OTC和处方止痛药或激素避孕药(女性)是可以接受的。

[1219] 17.在研究干预施用之前3个月内,积存注射或植入任何药物,可注射/可植入的避孕措施除外。

[1220] 18.持续使用草药补充剂或全身性非处方药物;参与者必须愿意在研究时期的持续时间期间停下来。

[1221] 19.在给药之前3个月内已接受研究药剂,或处于研究入组之前的另一项临床研究的随访中。

[1222] 20.在筛选时肝脏弹性成像(即FibroScan®)kPa>10.5。

[1223] 21.在筛选时,仰卧休息10分钟后收缩压>150mmHg,并且舒张压>95mmHg。

[1224] 22.筛选时确认的肝转氨酶(ALT或AST)>7x ULN

[1225] 23.持续或复发性高胆红素血症病史,除非有已知的吉尔伯特氏病或杜宾-约翰逊综合征

[1226] 24.人类免疫缺陷病毒(HIV)或丙型肝炎病毒(HCV)或丁型肝炎病毒(HDV)的抗体呈血清反应阳性

[1227] 25.Hgb<12g/dL(男性)或<11g/dL(女性)

[1228] 26.筛选时血清白蛋白<3.5g/dL

[1229] 27.筛选时WBC计数<4,000细胞/μL或绝对嗜中性粒细胞计数(ANC)<1800细胞/μL。

[1230] 28.筛选时血小板计数≤100,000/μL。

[1231] 29.筛选时国际标准比率(INR)或凝血酶原时间(PT)高于正常参考范围的上限(根据当地实验室参考范围)。

[1232] 30.血清BUN或肌酐>ULN

[1233] 31.血清淀粉酶或脂肪酶>1.25x ULN

[1234] 32.血清HbA1c>7.0%

[1235] 33.血清α胎蛋白(AFP)值>100ng/mL。如果筛查时的AFP>ULN但<100ng/mL,如果肝

影像学检查显示无疑似潜在HCC病变,则患者符合条件。

[1236] 34.研究人员认为临床上显著且不可接受的任何其他安全性实验室测试结果

[1237] 35.从进入临床研究中心之前48小时直到研究结束,已经经历或计划经历运动水平的显著变化。

[1238] 36.研究人员认为使参与者不适合入组或者可能干扰研究的参与或完成的任何状况。

[1239] B部分:GalNAc缀合的反义寡核苷酸的作用

[1240] 材料和方法

[1241] AAV/HBV小鼠模型

[1242] AAV-HBV小鼠模型是通过给C57BL/6小鼠注射含有可复制HBV基因组(AAV-HBV)的重组腺相关病毒而生成的。rAAV8-1.3HBV ayw病毒原液购自北京五加和分子医学研究所(中国北京)。动物(雄性,到达时4至5周龄)购自SLAC实验动物有限公司(中国上海),在动物设施中适应5天至7天,然后通过尾静脉注射1×10^{11}的AAV-HBV介体基因组(在200μL的PBS中稀释)。HBV基因组的持续表达可在三周之后建立,其中小鼠血清中包含高水平的HBV病毒标志物,包括HBV DNA、HBsAg和HBeAg。在C57BL/6小鼠的HBV病毒血症稳定且免疫系统胜任的情况下,使用了AAV-HBV小鼠模型来评估化合物的体内抗HBV效力。AAV-HBV研究的存活部分是通过科文斯药物研发(上海)有限公司(上海科文斯)的合同服务进行的,并且使用血清的死后分析是在上海罗氏创新中心(RICS)内部执行的。

[1243] 化合物处理之前七天,采集了血液样品用于制备血清(约15μL),并且基于血清中的HBV DNA、HBsAg水平以及体重,将感染AAV-HBV的动物分为不同的处理组。

[1244] 在第0天至第49天期间的第0天、第7天、第14天、第21天、第28天、第35天、第42天和第49天,每周一次皮下给药了1.5mg/kg或7.5mg/kg的盐水(01组)和CMP ID NO:15_1的抗HBV ASO。在第0天至第55天期间隔日一次(QOD)或在第0天至第49天的第0天、第7天、第14天、第21天、第28天、第35天、第42天和第49天每周一次(QW)通过口服灌胃施用了CMP ID NO:VI的TLR7激动剂100mg/kg。在整个研究过程中,每周一次经由眼球后窦对动物进行采血以收集样品。

[1245] 寡核苷酸合成

[1246] 寡核苷酸合成是本领域公知的。以下是可以实施的方案。就设备、载体和所用浓度而言,本发明的寡核苷酸可以通过略有变化的方法来产生。

[1247] 使用亚磷酰胺方法在Oligomaker 48上以1μmol规模在尿苷通用载体上合成寡核苷酸。合成结束时,使用氨水在60℃下将寡核苷酸从固体支持物上裂解5-16小时。通过反相HPLC(RP-HPLC)或通过固相萃取纯化寡核苷酸,通过UPLC进行表征,并通过ESI-MS进一步确认分子量。

[1248] 寡核苷酸的延伸:

[1249] 通过使用5'-O-DMT保护的亚酰胺在乙腈中的0.1M溶液和DCI(4,5-二氰基咪唑)在乙腈(0.25M)中用作激活剂来执行β-氰基乙基亚磷酰胺的偶联(DNA-A(Bz)、DNA-G(ibu)、DNA-C(Bz)、DNA-T、LNA-5-甲基-C(Bz)、LNA-A(Bz)、LNA-G(dmf)或LNA-T)。对于最后的循环,可以使用具有所需修饰的亚磷酰胺,例如,用于附接缀合物基团或这样的缀合物基团的C6接头。通过使用氢化黄原素(0.01M,在乙腈/吡啶9:1中)进行硫醇化以引入硫代磷酸酯键。

可利用0.02摩尔的碘于THF/吡啶/水7:2:1引入磷酸二酯键。其余试剂是通常用于寡核苷酸合成的试剂。

[1250] 对于固相合成后的缀合，可在固相合成的最后一个循环中使用可商购的C6氨基接头亚磷酰胺，并且在脱保护并从固体支持物上裂解后，分离出氨基联接的脱保护的寡核苷酸。使用标准合成方法通过官能团的活化来引入缀合物。

[1251] 通过RP-HPLC纯化：

[1252] 粗制化合物在Phenomenex Jupiter C18 10μ 150x10 mm色谱柱上通过制备型RP-HPLC纯化。0.1M醋酸铵pH 8和乙腈以5mL/min的流速用作缓冲液。将收集的级分冻干以给出纯化的化合物，通常为白色固体。

[1253] 缩写：

[1254] DCI:4,5-二氰基咪唑

[1255] DCM:二氯甲烷

[1256] DMF:二甲基甲酰胺

[1257] DMT:4,4'-二甲氧基三苯甲基

[1258] THF:四氢呋喃

[1259] Bz:苯甲酰基

[1260] Ibu:异丁酰基

[1261] RP-HPLC:反相高效液相色谱

[1262] T_m测定

[1263] 将寡核苷酸和RNA靶标(磷酸酯联接的，PO)双链体在500ml无RNase的水中稀释至3mM，并与500ml 2x T_m缓冲液(200mM NaCl、0.2mM EDTA、20mM磷酸钠、pH 7.0)混合。将溶液加热3分钟到95℃，然后在室温下退火30分钟。使用PE Templab软件在配备有Peltier温度编程器PTP6的Lambda 40UV/VIS分光光度计(Perkin Elmer)上测量双链体解链温度(T_m)。温度从20℃上升到95℃，然后下降到25℃，记录在260nm处的吸收。使用一阶导数以及解链和退火的局部最大值来评估双链体T_m。

[1264] 组织特异性体外接头裂解测定

[1265] 使用相关组织(例如肝脏或肾脏)和血清的匀浆对具有待测试的可生物裂解的接头(例如DNA磷酸二酯接头(PO接头))的FAM标记的寡核苷酸进行体外裂解。

[1266] 从合适的动物(例如小鼠、猴、猪或大鼠)收集组织和血清样品并在匀浆缓冲液(0.5％Igepal CA-630、25mM Tris pH 8.0、100mM NaCl、pH 8.0(用1N NaOH调整))中均化。组织匀浆和血清中加入寡核苷酸至200μg/g组织的浓度。样品在37℃下孵育24小时，之后用苯酚-氯仿萃取样品。在Dionex Ultimate 3000上使用Dionex DNApac p-100色谱柱和范围为10mM-1M高氯酸钠(pH 7.5)的梯度对溶液进行AIE HPLC分析。使用615nm的荧光检测器和260nm的UV检测器两者对照标准品确定裂解的和未裂解的寡核苷酸的含量。

[1267] S1核酸酶裂解测定

[1268] 对具有S1核酸酶敏感接头(例如DNA磷酸二酯接头(PO接头))的FAM标记的寡核苷酸在S1核酸酶提取物或血清中进行体外裂解。

[1269] 将100μM寡核苷酸在核酸酶缓冲液(60U pr.100μL)中通过S1核酸酶体外裂解20分钟至120分钟。通过将EDTA添加到缓冲溶液中来停止酶活性。在Dionex Ultimate 3000上使

用Dionex DNApac p-100色谱柱和范围为10mM-1M高氯酸钠(pH 7.5)的梯度对溶液进行AIE HPLC分析。使用615nm的荧光检测器和260nm的UV检测器两者对照标准品确定裂解的和未裂解的寡核苷酸的含量。

[1270] HBsAg抗原测量

[1271] 根据制造商的方案,使用HBsAg化学发光免疫测定法(CLIA)(中国郑州安图生物工程股份有限公司,目录号CL0310-2)确定了感染AAV-HBV的小鼠的血清中的血清HBsAg水平。简而言之,将50μl血清转移到了抗体包被的微量滴定板上,并加入了50μl酶缀合试剂。将该板于室温下在摇床上孵育了60分钟,然后使用自动洗濯器用洗涤缓冲液将所有孔洗涤了六次。将25μl底物A然后是25μl底物B添加到了每个孔中。在使用Envision发光读数器(Perkin Elmer)测量发光之前,将该板于室温下孵育了10分钟。HBsAg以单位IU/ml给出;其中1ng HBsAg=1.14IU。

[1272] HBeAg水平同样可使用CLIA ELISA试剂盒(Autobio Diagnostic#CL0310-2)根据制造商的方案和上面针对HBsAg给出的简要说明进行测量。

[1273] 来自HBV感染细胞的细胞内HBV mRNA的实时PCR

[1274] HBV mRNA可使用QuantStudio 12K Flex(应用生物系统)、TaqMan RNA到CT 1步试剂盒(应用生物系统,#4392938)、人类ACTB内源性对照(应用生物系统,#4310881E)通过qPCR在技术重复中进行定量。Taqman试剂与以下商购ThermoFisher Scientific引物(HBV Pa03453406_s1,ACTB 4310881E)一起使用。使用比较周期阈值2-ΔΔCt方法分析mRNA表达,该方法针对参考基因ACTB和经PBS处理的细胞进行了标准化。

[1275] HBV DNA提取和qPCR

[1276] 最初,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)将小鼠血清稀释了10倍(1:10)。使用MagNA Pure 96(罗氏)机器人提取了DNA。将50μl稀释血清在处理盒中与200ul MagNA Pure 96外部裂解缓冲液(罗氏,目录号06374913001)混合并孵育了10分钟。然后使用"MagNA Pure 96DNA和病毒核酸小容量试剂盒"(罗氏,目录号06543588001)和"病毒NA血浆SV外部裂解2.0"方案提取了DNA。DNA洗脱体积为50μl。

[1277] 使用Taqman qPCR机器(ViiA7,生命技术)对提取的HBV DNA执行了定量。在PCR中对每个DNA样品进行了一式两份测试。在384孔板中,将5μl DNA样品添加到15μl PCR mastermix中,其中包含10μl TaqMan Gene Expression Master Mix(应用生物系统,目录号4369016)、0.5μl PrimeTime XL qPCR引物/探针(IDT)和4.5μl蒸馏水,并且使用以下设置执行了PCR:UDG孵育(2分钟,50℃),酶激活(10分钟,95℃)和PCR(40个循环,其中对于变性为15秒,95°,并且对于退火和延伸为1分钟,60℃)。通过ViiA7软件从基于HBV质粒DNA标准曲线的C_t值计算了DNA拷贝数。

[1278] TaqMan引物的序列显示在表14中。

[1279] 表14:HBV核心特异性TaqMan探针

[1280]

	名称	染料	序列	SEQ ID NO
HBV核心引物	前向 (F3_HBVcore)		CTG TGC CTT GGG TGG CTT T	30
	反向 (R3_HBVcore)		AAG GAA AGA AGT CAG AAG GCA AAA	31
	TaqMan 探针 (P3_HBVcore)	56-FAM	56-FAM/AGC TCC AAA/ZEN/TTC TTT ATA AGG GTC GAT GTC CAT G/3IABkFQ	32

[1281] ZEN为内部猝灭剂

[1282] 实例B1

[1283] 该研究旨在提供证据表明,使用HBV体内效力小鼠模型,靶向HBV的GalNAc缀合的反义寡核苷酸(抗HBV ASO)和TLR7激动剂的组合将具有有益的抗病毒作用。

[1284] 在慢性HBV治疗中,直接作用的抗病毒药物的组合,诸如靶向HBV的GalNAc缀合的反义寡核苷酸(抗HBV ASO)和免疫调节剂,诸如toll样受体7激动剂(TLR7激动剂),可能以无法从每种仅单独的化合物单一疗法的活性预测的方式影响组合效果)。

[1285] 为了评估体内系统中抗HBV ASO和TLR7激动剂的组合,使用了慢性HBV感染的小鼠模型。在“材料和方法”中描述的AAV/HBV小鼠模型中,建立了持续的HBV感染,导致血浆中可检测到的病毒标志物(HBsAg、HBeAg、HBV DNA)的表达。已经评估了在单一疗法中或以组合的方式利用以1.5mg/kg或7.5mg/kg给药的CMP ID NO:15_1(表2和图4)的抗HBV ASO以及隔日一次(QOD)或每周一次(QW)以100mg给药的CMP ID NO:VI的TLR7激动剂(表3)进行治疗时对这些病毒标志物的作用。

[1286] 表15至表18显示了用不同剂量治疗后血清AAV/HBV小鼠中的HBV-DNA水平。数据也表示在图9A至图9D中。

[1287] 表15:用盐水(媒介物)治疗后血清AAV/HBV小鼠中的HBV-DNA水平;每周一次以1.5mg/kg给药CMP ID NO:15_1(抗HBV ASO);隔日一次(QOD)以100mg/kg施用CMP ID NO:VI(TLR7);或两者的组合;与抗HBV ASO 1.5mg/kg和TLR7 QOD相比计算用于该组合的p值;*p值≤0.05;**p值≤0.01;***p值≤0.001;ns不显著;†定量下限。

[1288]

	媒介物	抗 HBV ASO 1.5 mg/kg	TLR7 QOD	抗 HBV ASO 1.5 mg/kg + TLR7 QOD		
	平均 ±SD	平均 ±SD	平均 ±SD	平均 ±SD	组合的 p 值	
					相比抗 HBV ASO	相比 TLR7
D0	7.66 ± 0.39	7.69 ± 0.15	7.69 ± 0.19	7.67 ± 0.34	n/a	n/a
D7	7.38 ± 0.6	4.92 ± 0.19	5.74 ± 0.62	4.82 ± 0.09	ns	***
D14	7.24 ± 0.68	4.30† ± 0	5.73 ± 1.2	4.30† ± 0	ns	***
D21	7.12 ± 0.43	5.3† ± 0	5.55 ± 0.32	5.3† ± 0	ns	***
D28	7.44 ± 0.48	4.30† ± 0	5.23 ± 1.02	4.30† ± 0	ns	***
D35	7.4 ± 0.44	4.30† ± 0	4.69 ± 0.71	4.30† ± 0	ns	*
D42	7.34 ± 0.46	4.30† ± 0	4.72 ± 0.76	4.30† ± 0	ns	*
D49	7.4 ± 0.44	4.30† ± 0	4.5 ± 0.55	4.30† ± 0	ns	ns
D56	7.4 ± 0.44	4.30† ± 0	4.59 ± 0.65	4.30† ± 0	ns	ns
D63	7.5 ± 0.41	4.61 ± 0.7	5.3 ± 1.21	4.30† ± 0	ns	***
D70	7.41 ± 0.45	5 ± 1.02	5.95 ± 1.17	4.30† ± 0	**	***
D77	7.25 ± 0.59	5.92 ± 0.98	6.01 ± 1.17	4.52 ± 0.61	***	***
D84	7.2 ± 0.55	6.47 ± 0.69	6.26 ± 1.08	5.44 ± 1	***	***
D91	7.13 ± 0.4	6.75 ± 0.51	5.81 ± 1.09	5.7 ± 1.02	***	ns
D98	7.1 ± 0.21	6.89 ± 0.59	6.02 ± 1.17	6.08 ± 1.04	**	ns
D105	7.35 ± 0.33	7.16 ± 0.5	6.23 ± 1.29	6.54 ± 0.66	*	ns
D111	7.69 ± 0.27	7.23 ± 0.55	6.77 ± 0.64	6.85 ± 0.6	ns	ns

[1289] 表16:用盐水(媒介物)治疗后血清AAV/HBV小鼠中的HBV-DNA水平;每周一次以1.5mg/kg给药CMP ID NO:15_1(抗HBV ASO);每周一次(QW)以100mg/kg施用CMP ID NO:VI(TLR7);或两者的组合;与抗HBV ASO 1.5mg/kg和TLR7 QW相比计算用于该组合的p值。*p值≤0.05;**p值≤0.01;***p值≤0.001;ns不显著;†定量下限。

[1290]

	媒介物	抗 HBV ASO 1.5 mg/kg	TLR7 QW	抗 HBV ASO 1.5 mg/kg + TLR7 QW		
	平均 ±SD	平均 ±SD	平均 ±SD	平均 ±SD	组合的 p 值	
					相比抗 HBV ASO	相比 TLR7
D0	7.66 ± 0.39	7.69 ± 0.15	7.68 ± 0.2	7.78 ± 0.23	n/a	n/a

[1291]

D7	7.38	±	0.6	4.92	±	0.19	7.15	±	0.67	4.94	±	0.23	ns	***
D14	7.24	±	0.68	4.30†	±	0	7.14	±	0.47	4.30†	±	0	ns	***
D21	7.12	±	0.43	5.3†	±	0	6.65	±	0.75	5.3†	±	0	ns	***
D28	7.44	±	0.48	4.30†	±	0	6.1	±	1.25	4.30†	±	0	ns	***
D35	7.4	±	0.44	4.30†	±	0	6.61	±	0.98	4.30†	±	0	ns	***
D42	7.34	±	0.46	4.30†	±	0	6.4	±	0.84	4.5	±	0.55	ns	***
D49	7.4	±	0.44	4.30†	±	0	6.27	±	0.89	4.30†	±	0	ns	***
D56	7.4	±	0.44	4.30†	±	0	6.74	±	0.64	4.30†	±	0	ns	***
D63	7.5	±	0.41	4.61	±	0.7	6.72	±	0.7	4.30†	±	0	ns	***
D70	7.41	±	0.45	5	±	1.02	6.8	±	0.64	4.30†	±	0	**	***
D77	7.25	±	0.59	5.92	±	0.98	6.95	±	0.53	4.44	±	0.41	***	***
D84	7.2	±	0.55	6.47	±	0.69	6.87	±	0.49	4.68	±	0.7	***	***
D91	7.13	±	0.4	6.75	±	0.51	6.59	±	0.52	5.31	±	0.75	***	***
D98	7.1	±	0.21	6.89	±	0.59	6.7	±	0.4	5.88	±	0.77	**	***
D105	7.35	±	0.33	7.16	±	0.5	6.93	±	0.43	6.31	±	0.97	**	**
D111	7.69	±	0.27	7.23	±	0.55	7.07	±	0.45	6.77	±	0.55	*	*

[1292] 表17:用盐水(媒介物)治疗后血清AAV/HBV小鼠中的HBV-DNA水平;每周一次以7.5mg/kg给药CMP ID NO:15_1(抗HBV ASO);隔日一次(QOD)以100mg/kg施用CMP ID NO:VI(TLR7);或两者的组合;与抗HBV ASO 1.5mg/kg和TLR7 QOD相比计算用于该组合的p值;*p值≤0.05;**p值≤0.01;***p值≤0.001;ns不显著;†定量下限。

[1293]

	媒介物	**抗 HBV ASO 7.5 mg/kg**	**TLR7 QOD**	**抗 HBV ASO 7.5 mg/kg + TLR7 QOD**		
					组合的 p 值	
	平均 ±SD	平均 ±SD	平均 ±SD	平均 ±SD	相比抗 HBV ASO	相比 TLR7
D0	7.66 ± 0.39	7.67 ± 0.29	7.69 ± 0.19	7.62 ± 0.29	n/a	n/a
D7	7.38 ± 0.60	4.80 ± 0.00	5.74 ± 0.62	4.80 ± 0.00	ns	***
D14	7.24 ± 0.68	4.30† ± 0.00	5.73 ± 1.20	4.30† ± 0.00	ns	***
D21	7.12 ± 0.43	5.30† ± 0.00	5.55 ± 0.32	5.30† ± 0.00	ns	***
D28	7.44 ± 0.48	4.30† ± 0.00	5.23 ± 1.02	4.30† ± 0.00	ns	***
D35	7.40 ± 0.44	4.30† ± 0.00	4.69 ± 0.71	4.30† ± 0.00	ns	*
D42	7.34 ± 0.46	4.30† ± 0.00	4.72 ± 0.76	4.30† ± 0.00	ns	*
D49	7.40 ± 0.44	4.30† ± 0.00	4.50 ± 0.55	4.30† ± 0.00	ns	ns
D56	7.40 ± 0.44	4.30† ± 0.00	4.59 ± 0.65	4.30† ± 0.00	ns	ns
D63	7.50 ± 0.41	4.30† ± 0.00	5.30 ± 1.21	4.30† ± 0.00	ns	***
D70	7.41 ± 0.45	4.30† ± 0.00	5.95 ± 1.17	4.30† ± 0.00	ns	***
D77	7.25 ± 0.59	4.72 ± 0.60	6.01 ± 1.17	4.30† ± 0.00	ns	***
D84	7.20 ± 0.55	5.74 ± 0.17	6.26 ± 1.08	4.30† ± 0.00	***	***
D91	7.13 ± 0.40	5.97 ± 0.33	5.81 ± 1.09	4.70 ± 0.67	***	***
D98	7.10 ± 0.21	6.13 ± 0.26	6.02 ± 1.17	5.32 ± 0.93	**	***

[1294]

	媒介物	抗 HBV ASO 7.5 mg/kg	TLR7 QOD	抗 HBV ASO 7.5 mg/kg + TLR7 QOD		
					组合的 p 值	
	平均 ±SD	平均 ±SD	平均 ±SD	平均 ±SD	相比抗 HBV ASO	相比 TLR7
D105	7.35 ± 0.33	6.52 ± 0.44	6.23 ± 1.29	5.89 ± 0.88	**	**
D111	7.69 ± 0.27	7.00 ± 0.26	6.77 ± 0.64	6.33 ± 0.65	***	***

[1295] 表18:用盐水(媒介物)治疗后血清AAV/HBV小鼠中的HBV-DNA水平;每周一次以7.5mg/kg给药CMP ID NO:15_1(抗HBV ASO);每周一次(QW)以100mg/kg施用CMP ID NO:VI(TLR7);或两者的组合;与抗HBV ASO 1.5mg/kg和TLR7 QW相比计算用于该组合的p值;*p值≤0.05;**p值≤0.01;***p值≤0.001;ns不显著;†定量下限。

[1296]

	媒介物	抗 HBV ASO 7.5 mg/kg	TLR7 QW	抗 HBV ASO 7.5 mg/kg + TLR7 QW		
					组合的 p 值	
	平均 ±SD	平均 ±SD	平均 ±SD	平均 ±SD	相比抗 HBV ASO	相比 TLR7
D0	7.66 ± 0.39	7.67 ± 0.29	7.68 ± 0.20	7.67 ± 0.38	n/a	n/a
D7	7.38 ± 0.60	4.80 ± 0.00	7.15 ± 0.67	4.98 ± 0.28	ns	***
D14	7.24 ± 0.68	4.30† ± 0.00	7.14 ± 0.47	4.30† ± 0.00	ns	***
D21	7.12 ± 0.43	5.30† ± 0.00	6.65 ± 0.75	5.30† ± 0.00	ns	***
D28	7.44 ± 0.48	4.30† ± 0.00	6.10 ± 1.25	4.30† ± 0.00	ns	***
D35	7.40 ± 0.44	4.30† ± 0.00	6.61 ± 0.98	4.30† ± 0.00	ns	***
D42	7.34 ± 0.46	4.30† ± 0.00	6.40 ± 0.84	4.30† ± 0.00	ns	***
D49	7.40 ± 0.44	4.30† ± 0.00	6.27 ± 0.89	4.30† ± 0.00	ns	***
D56	7.40 ± 0.44	4.30† ± 0.00	6.74 ± 0.64	4.30† ± 0.00	ns	***
D63	7.50 ± 0.41	4.30† ± 0.00	6.72 ± 0.70	4.30† ± 0.00	ns	***
D70	7.41 ± 0.45	4.30† ± 0.00	6.80 ± 0.64	4.30† ± 0.00	ns	***
D77	7.25 ± 0.59	4.72 ± 0.60	6.95 ± 0.53	4.46 ± 0.44	ns	***
D84	7.20 ± 0.55	5.74 ± 0.17	6.87 ± 0.49	4.55 ± 0.69	***	***
D91	7.13 ± 0.40	5.97 ± 0.33	6.59 ± 0.52	4.87 ± 0.85	***	***
D98	7.10 ± 0.21	6.13 ± 0.26	6.70 ± 0.40	5.17 ± 1.06	***	***
D105	7.35 ± 0.33	6.52 ± 0.44	6.93 ± 0.43	6.07 ± 0.99	*	***
D111	7.69 ± 0.27	7.00 ± 0.26	7.07 ± 0.45	6.51 ± 0.69	*	**

[1297] 表15至表18以及图9A-D显示了对于CMP ID NO:15_1和CMP ID NO:VI的指定施用组合而言历经研究的持续时间病毒标志物HBV-DNA的变化。对于1.5mg/kg和7.5mg/kg的CMP ID NO:15_1(抗HBV ASO)单一疗法(图9A和C),以及对于含有任何浓度的抗HBV ASO的任何组合(图9A-D,实线),发现了HBV-DNA快速减少至低于测定的定量下限(LLOQ)。相比之下,当仅用TLR7激动剂(CM ID NO:VI)治疗时,HBV-DNA的减少仅当隔日一次(QOD)给药时达到LLOQ(图9A和C)。在QW给药处(图9B和D),用TLR7激动剂单一疗法实现了约1.5-log的最大程度的减少。

[1298] 在给药终点之后,所有治疗组中的HBV-DNA水平都有部分反弹,其中1.5mg/kg剂量单一疗法中的抗HBV ASO的绝对反弹幅度最大(图9A和B)。该组中的HBV DNA血浆水平恢复

到对照组的1/2log以内。同样，经TLR7激动剂治疗的动物，无论是QOD给药还是QW给药单一疗法，在随访时期期间的反弹都回到了对照组的1log以内。这种反弹虽然与抗HBV ASO的幅度不同，但在治疗终点之后比经抗HBV ASO治疗的组发生得更早。

[1299] 与用每种单一化合物的治疗相比，在用抗HBV ASO和TLR7激动剂之间的组合治疗的组中通过HBV DNA测量的反弹总是延缓。值得注意的是，高剂量抗HBV-ASO的发作延缓和反弹动力学在频繁和较不频繁给药TLR7激动剂的组合之间是相似的，其中反弹分别从第91天和第84天开始。有趣的是，在最低组合剂量处(图8B)，反弹似乎开始于第84天，这晚于具有高TLR7激动剂剂量的低抗HBV ASO(图8A)(其中在第77天观察到反弹)。因此，似乎当组合抗HBV ASO和TLR7激动剂时TLR7的治疗窗增加，因为与在TLR7激动剂单一治疗的情况下所观察到的相比，减少3倍的剂量不会对观察到反弹的时间产生负面影响。

[1300] 表19至表22显示了用不同剂量治疗之后血清AAV/HBV小鼠中的HBsAg水平。数据也表示在图10A至图10D中。

[1301] 表19：用盐水(媒介物)治疗后血清AAV/HBV小鼠中的HBsAg水平；每周一次以1.5mg/kg给药CMP ID NO:15_1(抗HBV ASO)；隔日一次(QOD)以100mg/kg施用CMP ID NO:VI(TLR7)；或两者的组合；与a)抗HBV ASO 1.5mg/kg和b)TLR7 QOD相比计算用于该组合的p值。*p值≤0.05；**p值≤0.01；***p值≤0.001；ns不显著。

[1302]

	媒介物	抗 HBV ASO 1.5 mg/kg	TLR7 QOD	抗 HBV ASO 1.5 mg/kg + TLR7 QOD		
					组合的 p 值	
	平均 ±SD	平均 ±SD	平均 ±SD	平均 ±SD	相比抗 HBV ASO	相比 TLR7
D0	4.29 ± 0.36	4.34 ± 0.26	4.14 ± 0.37	4.27 ± 0.4	n/a	n/a
D7	4.05 ± 0.61	2.6 ± 0.45	3.68 ± 1.03	2.53 ± 0.9	ns	***
D14	3.6 ± 0.91	2.53 ± 0.34	3.11 ± 1.35	1.87 ± 0.63	*	***
D21	3.38 ± 0.99	2.14 ± 0.35	2.62 ± 1.41	1.56 ± 0.52	*	***
D28	3.46 ± 1.18	2.12 ± 0.82	2.21 ± 1.28	1.33 ± 0.51	**	**
D35	3.59 ± 1.05	1.84 ± 0.46	1.78 ± 1.18	1.33 ± 0.49	ns	ns
D42	3.55 ± 1.18	1.66 ± 0.51	1.57 ± 0.97	1.18 ± 0.42	ns	ns
D49	3.54 ± 1.08	1.78 ± 0.43	1.63 ± 0.86	0.97 ± 0.58	**	*
D56	3.45 ± 0.99	1.62 ± 0.43	1.56 ± 0.77	1.27 ± 0.41	ns	ns
D63	3.45 ± 0.96	1.97 ± 0.88	1.61 ± 0.96	1.14 ± 0.66	**	ns
D70	3.39 ± 1.12	2.87 ± 1.14	1.9 ± 1.23	1.53 ± 0.97	**	ns
D77	3.15 ± 1.17	3.2 ± 1.03	1.91 ± 1.18	1.77 ± 1.09	**	ns
D84	3.33 ± 1	3.58 ± 1.03	2.25 ± 1.16	2.18 ± 1.22	**	ns
D91	3.65 ± 1	3.89 ± 1.12	2.05 ± 1.35	2.35 ± 1.46	***	ns
D98	3.69 ± 0.84	3.87 ± 1.07	2.36 ± 1.26	2.7 ± 1.32	**	ns
D105	3.69 ± 0.85	3.96 ± 1.11	2.41 ± 1.18	2.68 ± 1.19	**	ns
D111	3.89 ± 0.84	4.07 ± 1.1	2.69 ± 1.38	2.99 ± 1.33	*	ns

[1303] 表20：用盐水(媒介物)治疗后血清AAV/HBV小鼠中的HBsAg水平；每周一次以1.5mg/kg给药CMP ID NO:15_1(抗HBV ASO)；每周一次(QW)以100mg/kg施用CMP ID NO:VI(TLR7)；或两者的组合；与a)抗HBV ASO1.5mg/kg和b)TLR7 QW相比计算用于该组合的p值。*p值≤0.05；**p值≤0.01；***p值≤0.001；ns不显著。

[1304]

	媒介物	抗 HBV ASO 1.5 mg/kg	TLR7 QW	抗 HBV ASO 1.5 mg/kg + TLR7 QW		
					组合的 p 值	
	平均 ±SD	平均 ±SD	平均 ±SD	平均 ±SD	相比抗 HBV ASO	相比 TLR7
D0	4.29 ± 0.36	4.34 ± 0.26	4.07 ± 0.44	4.35 ± 0.14	n/a	n/a
D7	4.05 ± 0.61	2.6 ± 0.45	3.72 ± 0.85	2.8 ± 0.39	ns	***
D14	3.6 ± 0.91	2.53 ± 0.34	3.52 ± 0.96	2.3 ± 0.49	ns	***
D21	3.38 ± 0.99	2.14 ± 0.35	3.07 ± 1.22	1.89 ± 0.53	ns	***
D28	3.46 ± 1.18	2.12 ± 0.82	2.65 ± 1.37	1.38 ± 0.52	*	***

[1305]

	媒介物	抗 HBV ASO 1.5 mg/kg	TLR7 QW	抗 HBV ASO 1.5 mg/kg + TLR7 QW		
					组合的 p 值	
	平均 ±SD	平均 ±SD	平均 ±SD	平均 ±SD	相比抗 HBV ASO	相比 TLR7
D35	3.59 ± 1.05	1.84 ± 0.46	2.49 ± 1.29	1.48 ± 0.36	ns	***
D42	3.55 ± 1.18	1.66 ± 0.51	2.28 ± 1.28	1.28 ± 0.41	ns	***
D49	3.54 ± 1.08	1.78 ± 0.43	1.9 ± 1.07	1.12 ± 0.45	*	**
D56	3.45 ± 0.99	1.62 ± 0.43	2.13 ± 1	1.26 ± 0.35	ns	**
D63	3.45 ± 0.96	1.97 ± 0.88	2.43 ± 1.14	1.26 ± 0.64	*	***
D70	3.39 ± 1.12	2.87 ± 1.14	2.48 ± 1.23	1.15 ± 0.36	***	***
D77	3.15 ± 1.17	3.2 ± 1.03	2.41 ± 1.16	1.28 ± 0.36	***	***
D84	3.33 ± 1	3.58 ± 1.03	2.66 ± 1.15	1.34 ± 0.47	***	***
D91	3.65 ± 1	3.89 ± 1.12	2.66 ± 1.44	1.55 ± 0.96	***	***
D98	3.69 ± 0.84	3.87 ± 1.07	2.83 ± 1.16	2.2 ± 0.91	***	*
D105	3.69 ± 0.85	3.96 ± 1.11	2.81 ± 1.1	2.25 ± 0.9	***	*
D111	3.89 ± 0.84	4.07 ± 1.1	3.1 ± 1.12	2.51 ± 0.99	***	*

[1306] 表21:用盐水(媒介物)治疗后血清AAV/HBV小鼠中的HBsAg水平;每周一次以7.5mg/kg给药CMP ID NO:15_1(抗HBV ASO);隔日一次(QOD)以100mg/kg施用CMP ID NO:VI(TLR7);或两者的组合;与a)抗HBV ASO 7.5mg/kg和b)TLR7 QOD相比计算用于该组合的p值。*p值≤0.05;**p值≤0.01;***p值≤0.001;ns不显著。

[1307]

	媒介物	抗 HBV ASO 7.5 mg/kg	TLR7 QOD	抗 HBV ASO 7.5 mg/kg + TLR7 QOD	组合的 p 值	
	平均 ±SD	平均 ±SD	平均 ±SD	平均 ±SD	相比抗 HBV ASO	相比 TLR7
D0	4.29 ± 0.36	4.30 ± 0.30	4.14 ± 0.37	4.20 ± 0.31	n/a	n/a
D7	4.05 ± 0.61	1.71 ± 0.24	3.68 ± 1.03	1.48 ± 0.45	ns	***
D14	3.60 ± 0.91	1.83 ± 0.21	3.11 ± 1.35	1.31 ± 0.34	ns	***
D21	3.38 ± 0.99	1.43 ± 0.17	2.62 ± 1.41	1.19 ± 0.31	ns	***
D28	3.46 ± 1.18	1.30 ± 0.19	2.21 ± 1.28	1.07 ± 0.36	ns	***
D35	3.59 ± 1.05	1.36 ± 0.26	1.78 ± 1.18	0.79 ± 0.35	*	***
D42	3.55 ± 1.18	1.30 ± 0.16	1.57 ± 0.97	0.90 ± 0.32	ns	*
D49	3.54 ± 1.08	1.56 ± 0.16	1.63 ± 0.86	1.05 ± 0.27	ns	*
D56	3.45 ± 0.99	1.32 ± 0.24	1.56 ± 0.77	1.08 ± 0.27	ns	ns
D63	3.45 ± 0.96	1.33 ± 0.47	1.61 ± 0.96	0.92 ± 0.28	ns	**

[1308]

	媒介物	抗 HBV ASO 7.5 mg/kg	TLR7 QOD	抗 HBV ASO 7.5 mg/kg + TLR7 QOD	组合的 p 值	
	平均 ±SD	平均 ±SD	平均 ±SD	平均 ±SD	相比抗 HBV ASO	相比 TLR7
D70	3.39 ± 1.12	2.18 ± 0.91	1.90 ± 1.23	1.07 ± 0.24	**	**
D77	3.15 ± 1.17	2.70 ± 0.85	1.91 ± 1.18	1.08 ± 0.20	***	**
D84	3.33 ± 1.00	3.17 ± 0.60	2.25 ± 1.16	1.18 ± 0.24	***	***
D91	3.65 ± 1.00	3.82 ± 0.38	2.05 ± 1.35	1.38 ± 0.85	***	*
D98	3.69 ± 0.84	3.64 ± 0.81	2.36 ± 1.26	2.26 ± 0.92	***	ns
D105	3.69 ± 0.85	3.61 ± 0.97	2.41 ± 1.18	2.39 ± 0.93	**	ns
D111	3.89 ± 0.84	3.40 ± 1.49	2.69 ± 1.38	2.55 ± 1.06	*	ns

[1309] 表22:用盐水(媒介物)治疗后血清AAV/HBV小鼠中的HBsAg水平;每周一次以7.5mg/kg给药CMP ID NO:15_1(抗HBV ASO);每周一次(QW)以100mg/kg施用CMP ID NO:VI(TLR7);或两者的组合;与a)抗HBV ASO7.5mg/kg和b)TLR7激动剂QW相比计算用于该组合的p值。*p值≤0.05;**p值≤0.01;***p值≤0.001;ns不显著。

[1310]

	媒介物	抗 HBV ASO 7.5 mg/kg	TLR7 QW	抗 HBV ASO 7.5 mg/kg + TLR7 QW		
					组合的 p 值	
	平均 ±SD	平均 ±SD	平均 ±SD	平均 ±SD	相比抗 HBV ASO	相比 TLR7
D0	4.29 ± 0.36	4.30 ± 0.30	4.07 ± 0.44	4.07 ± 0.41	n/a	n/a
D7	4.05 ± 0.61	1.71 ± 0.24	3.72 ± 0.85	1.52 ± 0.37	ns	***
D14	3.60 ± 0.91	1.83 ± 0.21	3.52 ± 0.96	1.45 ± 0.30	ns	***
D21	3.38 ± 0.99	1.43 ± 0.17	3.07 ± 1.22	1.27 ± 0.31	ns	***
D28	3.46 ± 1.18	1.30 ± 0.19	2.65 ± 1.37	1.09 ± 0.36	ns	***
D35	3.59 ± 1.05	1.36 ± 0.26	2.49 ± 1.29	1.30 ± 0.42	ns	***
D42	3.55 ± 1.18	1.30 ± 0.16	2.28 ± 1.28	1.12 ± 0.39	ns	***
D49	3.54 ± 1.08	1.56 ± 0.16	1.90 ± 1.07	0.82 ± 0.47	*	***
D56	3.45 ± 0.99	1.32 ± 0.24	2.13 ± 1.00	1.10 ± 0.29	ns	***
D63	3.45 ± 0.96	1.33 ± 0.47	2.43 ± 1.14	1.09 ± 0.50	ns	***
D70	3.39 ± 1.12	2.18 ± 0.91	2.48 ± 1.23	1.12 ± 0.59	*	***
D77	3.15 ± 1.17	2.70 ± 0.85	2.41 ± 1.16	1.14 ± 0.81	***	***
D84	3.33 ± 1.00	3.17 ± 0.60	2.66 ± 1.15	1.47 ± 1.05	***	***
D91	3.65 ± 1.00	3.82 ± 0.38	2.66 ± 1.44	1.52 ± 1.47	***	***
D98	3.69 ± 0.84	3.64 ± 0.81	2.83 ± 1.16	1.83 ± 1.39	***	**

[1311]

D105	3.69 ± 0.85	3.61 ± 0.97	2.81 ± 1.10	2.08 ± 1.30	***	*
D111	3.89 ± 0.84	3.40 ± 1.49	3.10 ± 1.12	2.25 ± 1.24	**	**

[1312] 还测量了HBeAg水平,但未观察到单一治疗和组合治疗之间的明显差异。

[1313] 表19至表22以及图10A至图10D表明,对HBsAg的影响通常类似于对HBV-DNA的影响。与HBV DNA不同,用1.5mg/kg抗HBV ASO(CMP ID NO:15)治疗不能将HBsAg抑制到低于检测限的水平(图10A和图10B),而任何剂量的TLR7激动剂(CMP ID NO:VI)也不能(图10A至图10D)。另一方面,抗HBV ASO和TLR7激动剂的组合能够在所有剂量下将HBsAg降低至低于检测限,并与单一治疗相比延缓反弹。与HBV DNA一样,也观察到与HBsAg减少有关的至少TLR7激动剂的治疗窗增加,并且对于HBsAg而言其甚至更明显,因为最低剂量的组合(图10B)基本上与最高剂量的组合(图10C)在HBsAg减少和反弹延缓两方面都同样有效,其表明抗HBV ASO的治疗窗也可能增加。

[1314] 研究结论

[1315] 研究中的数据显示了抗HBV ASO和TLR7激动剂的组合在慢性HBV感染体内模型中的益处。如通过HBV DNA和HBsAg两者所衡量的,这些益处可以最清楚地被视为治疗结束后反弹延缓。没有迹象表明该组合会改变这些化合物的风险状况,并且临床环境中每种活性成分的较低剂量可以实现与较高剂量的组合相同的抗病毒效果。组合的治疗窗的这种积极增加对患者来说是一个明显的益处。

[1316] C部分:比较RNAi和反义寡核苷酸的作用

[1317] 实例C1

[1318] 本研究的目的是评估某些化合物在AAV-HBV小鼠模型中的体内药理学和效力。

[1319] 测试的化合物:阴性对照siRNA(DCR-AUD1,一种不靶向HBV基因组的siRNA);HBV

(s)-219(抗HBV siRNA);和CMP ID NO:15_1(抗HBV ASO)。

[1320] 携带乙型肝炎病毒(HBV)基因组rAAV8-1.3HBV ayw(批号:2019032703)的重组腺相关病毒(AAV)购自北京五加和分子医学研究所,并且在使用前于-70℃储存。

[1321] 获得了一百一十五(115)只雄性C57BL/6小鼠。在给药前第0天,所有动物都通过尾静脉注射了1×10^{11}AAV-HBV介体基因组进行模型诱导。基于给药前第24天的基线血清病毒标志物和体重,选择了80只合格的HBV感染小鼠。

[1322] 选择的80只小鼠被随机分成了4组进行化合物治疗。在第0天以5mL/kg皮下注射一次无菌水、DCR-AUD1、DCR-S219(9mg/kg)和CMP ID NO:15_1(6.6mg/kg)。给药体积为2mL。

[1323] 在第0天至第21天期间每周一次测量了体重。在研究阶段期间,研究组之间未观察到体重增长的显著差异。

[1324] 在第0天至第21天期间每周两次收集了全血来制备血清(每只小鼠15μL)。在第21天,对小鼠实施了安乐死。除了用于病毒标志物测定的血清样品外,还制备了额外的血清样品(每只小鼠120μL)并于-70℃储存。收集了全肝脏,切成两半,速冻并于-70℃储存。剩余的给药制剂以及终末血清和组织样品分别于2019年11月16日和20日进行了处置。

[1325] 通过ARCHITECT i2000(美国伊利诺伊州布拉夫湖的雅培实验室)和支持试剂测定了HBsAg的基线血清水平。通过使用ABI7500(美国加利福尼亚州福斯特城的应用生物系统)和检测试剂盒(中国湖南长沙的圣湘生物科技股份有限公司)测量了基线血清HBV DNA水平。

[1326] 结果显示在图30中:抗HBV ASO(HBV-LNA)使HBsAg水平迅速下降,并一直保持了大约10天,之后HBsAg水平反弹。靶向HBV的siRNA化合物(DCR-S219)使HBsAg水平的初始降低速度稍慢但仍是非常快速的。此外,利用siRNA化合物,历经实验的21天保持了令人印象深刻的降低的水平,且没有反弹的迹象。在图30中可以看到siRNA化合物更进一步的益处,即,用比LNA化合物低得多的摩尔剂量获得了优异的结果。图30显示了来自被给药9mg/kg siRNA和6.6mg/kg LNA的小鼠的结果。然而,由于这些化合物之间的分子量不同,siRNA的摩尔剂量仅为LNA的0.3倍左右(DCR-S219的M_w为22262Da,而CMP ID NO:15_1的M_w为6638Da)。因此,远低于反义寡核苷酸的摩尔剂量的本发明的siRNA的摩尔剂量可以获得优异的结果。

[1327] 与抗HBV ASO和TLR7激动剂的数据组合时的数据(例如,如实例B和图9中所示)表明了将TLR7激动剂与RNAi寡核苷酸(例如靶向HBV的siRNA)相组合的益处。

[1328] 如图10A所示,单独的TLR7激动剂提供了HBsAg减少,但HBsAg的初始减少速度较慢(在第42天处看到的最低HBsAg)。因此,使用RNAi寡核苷酸(例如靶向HBV的siRNA)与TLR7激动剂存在协同作用,因为实例C/图30中靶向HBV的siRNA实现了快速有效的HBsAg敲低,即10天。此外,如图30所示,靶向HBV的siRNA提供了非常有效的长期敲低,优于抗HBV ASO。

[1329] 根据本文公开的数据,可以确定包含1)RNAi寡核苷酸,如靶向HBV的siRNA和2)TLR7激动剂的组合的效果因此将是快速诱导的、长持续时间的有效HBsAg敲低,表明了长期有效的抗病毒控制。因此,包含RNAi寡核苷酸和TLR7激动剂的组合是本发明最优选的组合。

[1330] 在发现本文公开的实例的部分A、B和C之前无法预期此类有益效果。

序列表

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> 用于治疗 HBV 的靶向 HBV 的治疗性寡核苷酸和 TLR7 激动剂的药物组合

<130> P119810PCT2

<150> PCT/CN2020/107002
<151> 2020-08-05

<150> PCT/CN2019/127972
<151> 2019-12-24

<160> 91

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1
<211> 3182
<212> DNA
[0001] <213> 乙型肝炎病毒

<400> 1
aattccacaa cctttcacca aactctgcaa gatcccagag tgagaggcct gtatttccct 60

gctggtggct ccagttcagg agcagtaaac cctgttccga ctactgcctc tcccttatcg 120

tcaatcttct cgaggattgg ggaccctgcg ctgaacatgg agaacatcac atcaggattc 180

ctaggacccc ttctcgtgtt acaggcgggg ttttttcttgt tgacaagaat cctcacaata 240

ccgcagagtc tagactcgtg gtggacttct ctcaattttc tagggggaac taccgtgtgt 300

cttggccaaa attcgcagtc cccaacctcc aatcactcac caacctcctg tcctccaact 360

tgtcctggtt atcgctggat gtgtctgcgg cgttttatca tcttcctctt catcctgctg

420

ctatgcctca tcttcttgtt ggttcttctg gactatcaag gtatgttgcc cgtttgtcct
480

ctaattccag gatcctcaac caccagcacg ggaccatgcc gaacctgcat gactactgct
540

caaggaacct ctatgtatcc ctcctgttgc tgtaccaaac cttcggacgg aaattgcacc
600

tgtattccca tcccatcatc ctgggctttc ggaaaattcc tatgggagtg ggcctcagcc
660

cgtttctcct ggctcagttt actagtgcca tttgttcagt ggttcgtagg gctttccccc
720

actgtttggc tttcagttat atggatgatg tggtattggg ggccaagtct gtacagcatc
780

ttgagtccct ttttaccgct gttaccaatt ttcttttgtc tttgggtata catttaaacc
[0002] 840

ctaacaaaac aaagagatgg ggttactctc tgaattttat gggttatgtc attggaagtt
900

atgggtcctt gccacaagaa cacatcatac aaaaaatcaa agaatgtttt agaaaacttc
960

ctattaacag gcctattgat tggaaagtat gtcaacgaat tgtgggtctt ttgggttttg
1020

ctgccccatt tacacaatgt ggttatcctg cgttaatgcc cttgtatgca tgtattcaat
1080

ctaagcaggc tttcactttc tcgccaactt acaaggcctt tctgtgtaaa caatacctga
1140

acctttaccc cgttgcccgg caacggccag gtctgtgcca agtgtttgct gacgcaaccc
1200

ccactggctg gggcttggtc atgggccatc agcgcgtgcg tggaaccttt tcggctcctc
1260

tgccgatcca tactgcggaa ctcctagccg cttgttttgc tcgcagcagg tctggagcaa
1320

acattatcgg gactgataac tctgttgtcc tctcccgcaa atatacatcg tatccatggc
1380

tgctaggctg tgctgccaac tggatcctgc gcgggacgtc ctttgtttac gtcccgtcgg
1440

cgctgaatcc tgcggacgac ccttctcggg gtcgcttggg actctctcgt ccccttctcc
1500

gtctgccgtt ccgaccgacc acggggcgca cctctcttta cgcggactcc ccgtctgtgc
1560

cttctcatct gccggaccgt gtgcacttcg cttcacctct gcacgtcgca tggagaccac
1620

cgtgaacgcc caccgaatgt tgcccaaggt cttacataag aggactcttg gactctctgc
1680

[0003] aatgtcaacg accgaccttg aggcatactt caaagactgt ttgtttaaag actgggagga
1740

gttgggggag gagattagat taaaggtctt tgtactagga ggctgtaggc ataaattggt
1800

ctgcgcacca gcaccatgca acttttcac ctctgcctaa tcatctcttg ttcatgtcct
1860

actgttcaag cctccaagct gtgccttggg tggctttggg gcatggacat cgacccttat
1920

aaagaatttg gagctactgt ggagttactc tcgtttttgc cttctgactt ctttccttca
1980

gtacgagatc ttctagatac cgcctcagct ctgtatcggg aagccttaga gtctcctgag
2040

cattgttcac ctcaccatac tgcactcagg caagcaattc tttgctgggg ggaactaatg
2100

actctagcta cctgggtggg tgttaatttg gaagatccag catctagaga cctagtagtc
2160

agttatgtca acactaatat gggcctaaag ttcaggcaac tcttgtggtt tcacatttct
2220

tgtctcactt ttggaagaga aaccgttata gagtatttgg tgtctttcgg agtgtggatt
2280

cgcactcctc cagcttatag accaccaaat gcccctatcc tatcaacact tccggaaact
2340

actgttgtta gacgacgagg caggtcccct agaagaagaa ctccctcgcc tcgcagacga
2400

aggtctcaat cgccgcgtcg cagaagatct caatctcggg aacctcaatg ttagtattcc
2460

ttggactcat aaggtgggga actttactgg tctttattct tctactgtac ctgtctttaa
2520

tcctcattgg aaaacaccat cttttcctaa tatacattta caccaagaca ttatcaaaaa
2580

[0004] atgtgaacag tttgtaggcc cacttacagt taatgagaaa agaagattgc aattgattat
2640

gcctgctagg ttttatccaa aggttaccaa atatttacca ttggataagg gtattaaacc
2700

ttattatcca gaacatctag ttaatcatta cttccaaact agacactatt tacacactct
2760

atggaaggcg ggtatattat ataagagaga aacaacacat agcgcctcat tttgtgggtc
2820

accatattct tgggaacaag atctacagca tggggcagaa tctttccacc agcaatcctc
2880

tgggattctt tcccgaccac cagttggatc cagccttcag agcaaacaca gcaaatccag
2940

attgggactt caatcccaac aaggacacct ggccagacgc caacaaggta ggagctggag
3000

cattcgggct gggtttcacc ccaccgcacg gaggcctttt ggggtggagc cctcaggctc

3060

agggcatact acaaactttg ccagcaaatc cgcctcctgc ctccaccaat cgccagacag
3120

gaaggcagcc taccccgctg tctccacctt tgagaaacac tcatcctcag gccatgcagt
3180

gg
3182

<210> 2
<211> 13
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 连续核苷酸序列

<400> 2
[0005] gcgtaaagag agg
13

<210> 3
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 连续核苷酸序列

<400> 3
gcgtaaagag aggt
14

<210> 4
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 连续核苷酸序列

<400> 4
cgcgtaaaga gaggt
15

<210> 5
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 连续核苷酸序列

<400> 5
agaaggcaca gacgg
15

[0006]

<210> 6
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 连续核苷酸序列

<400> 6
gagaaggcac agacgg
16

<210> 7
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 连续核苷酸序列

<400> 7
agcgaagtgc acacgg
16

<210> 8
<211> 13
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 连续核苷酸序列

<400> 8
gaagtgcaca cgg
13

<210> 9
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 连续核苷酸序列

[0007]

<400> 9
gcgaagtgca cacgg
15

<210> 10
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 连续核苷酸序列

<400> 10
agcgaagtgc acacg
15

<210> 11
<211> 13
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 连续核苷酸序列

<400> 11
cgaagtgcac acg
13

<210> 12
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 连续核苷酸序列

<400> 12
aggtgaagcg aagtgc
16

[0008]

<210> 13
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 连续核苷酸序列

<400> 13
aggtgaagcg aagtg
15

<210> 14
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 连续核苷酸序列

<400> 14
aggtgaagcg aagt
14

<210> 15
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡核苷酸序列

<400> 15
cagcgtaaag agagg
15

[0009]

<210> 16
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡核苷酸序列

<400> 16
cagcgtaaag agaggt
16

<210> 17
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡核苷酸序列

<400> 17
cacgcgtaaa gagaggt
17

<210> 18
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡核苷酸序列

<400> 18
caagaaggca cagacgg
17

<210> 19
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡核苷酸序列

[0010] <400> 19
cagagaaggc acagacgg
18

<210> 20
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡核苷酸序列

<400> 20
caagcgaagt gcacacgg
18

<210> 21
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡核苷酸序列

<400> 21
cagaagtgca cacgg
15

<210> 22
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡核苷酸序列

<400> 22
cagcgaagtg cacacgg
17

[0011]

<210> 23
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡核苷酸序列

<400> 23
caagcgaagt gcacacg
17

<210> 24
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡核苷酸序列

<400> 24
cacgaagtgc acacg

15

<210> 25
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡核苷酸序列

<400> 25
caaggtgaag cgaagtgc
18

<210> 26
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

[0012]

<220>
<223> 寡核苷酸序列

<400> 26
caaggtgaag cgaagtg
17

<210> 27
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡核苷酸序列

<400> 27
caaggtgaag cgaagt
16

<210> 28
<211> 69

<212> DNA
<213> 乙型肝炎病毒

<400> 28
cctctcttta cgcggactcc ccgtctgtgc cttctcatct gccggaccgt gtgcacttcg
60

cttcacctc
69

<210> 29
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡核苷酸基序

<400> 29
gcagaggtga agcgaagtgc
20

[0013]

<210> 30
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 30
ctgtgccttg ggtggcttt
19

<210> 31
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 31
aaggaaagaa gtcagaaggc aaaa
24

<210> 32
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 探针

<400> 32
agctccaaat tctttataag ggtcgatgtc catg
34

<210> 33
<211> 18
<212> RNA
[0014] <213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> n 是 a、c、g 或 u

<400> 33
acaanaaucc ucacaaua
18

<210> 34
<211> 15
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> n 是 a、c、g 或 u

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> n 是 a、c、g 或 u

<400> 34
uunuugugag gauun
15

<210> 35
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

[0015]

<220>
<223> 合成多核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> n 是 a、c、g 或 u

<400> 35
uuauugugag gauunuuguc
20

<210> 36
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> n 是 a、c、g 或 u

<400> 36
uuauugugag gauunuuguc gg
22

<210> 37
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 37
uuauugugag gauucuuguc gg
22

[0016]

<210> 38
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 38
uuauugugag gauuuuuguc gg
22

<210> 39
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> n 是 a、c、g 或 u

<400> 39
acaanaaucc ucacaauaa
19

<210> 40
<211> 36
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

[0017]

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> n 是 a、c、g 或 u

<400> 40
gacaanaauc cucacaauaa gcagccgaaa ggcugc
36

<210> 41
<211> 36
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 41
gacaaaaauc cucacaauaa gcagccgaaa ggcugc
36

<210> 42
<211> 36
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 42
gacaagaauc cucacaauaa gcagccgaaa ggcugc
36

<210> 43
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

[0018] <400> 43
aatcctcaca
10

<210> 44
<211> 10
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 44
ugugaggauu
10

<210> 45
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 45
tgtgaggatt
10

<210> 46
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 46
tattgtgagg attcttgtca
20

[0019] <210> 47
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 47
cggtattgtg aggattcttg
20

<210> 48
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 48

tgtgaggatt cttgtcaaca
20

<210> 49
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 49
uauugugagg auuuuuguca a
21

<210> 50
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

[0020]

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 50
ugcgguauug ugaggauuct t
21

<210> 51
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 51
acagcattgt gaggattctt gtc
23

<210> 52

<210> 23
<211> RNA
<212> 人工序列
<213>

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 52
uauugugagg auuuuuguca aca
23

<210> 53
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 53
auugugagga uuuuugucaa caa
23

[0021]

<210> 54
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 54
uugugaggau uuuugucaac aag
23

<210> 55
<211> 36
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 55
gugguggacu ucucucaaua gcagccgaaa ggcugc
36

<210> 56
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 56
uauugagaga aguccaccac gg
22

[0022]

<210> 57
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 57
uuugugagga uuuuugucaa gg
22

<210> 58
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 58
ucugagagaa guccaccacg gg

<210> 59
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 59
uacugagaga aguccaccac gg
22

<210> 60
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

[0023]
<400> 60
uaaaacugag agaaguccac gg
22

<210> 61
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 61
gacaagaatc ctcacaata
19

<210> 62
<211> 19
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 62
cgtggtggac ttctctcaa
19

<210> 63
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 63
gtggacttct ctcaatttt
19

[0024]

<210> 64
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> n 是 a、c、g 或 t

<400> 64
gacaanaatc ctcacaata
19

<210> 65
<211> 19

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(19)
<223> n 是 a、c、g 或 t

<400> 65
cgtggtggac ttctctcan
19

<210> 66
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

[0025]

<220>
<223> 合成多核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> n 是 a、c、g 或 t

<400> 66
gtggacttct ctcantttt
19

<210> 67
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 67
tgttgacaag aatcctcaca at
22

<210> 68
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 68
tcgtggtgga cttctctcaa t
21

<210> 69
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

[0026]

<220>
<223> 合成多核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> n 是 a、c、g 或 t

<400> 69
tgttgacaan aatcctcaca at
22

<210> 70
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> n 是 a、c、g 或 t

<400> 70
tcgtggtgga cttctctcan t
21

<210> 71
<211> 36
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 71
ugcacuucgc gucaccucua gcagccgaaa ggcugc
36

[0027]

<210> 72
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 72
uagaggugac gcgaagugca gg
22

<210> 73
<211> 36
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 73
gcaccucucu uuacgcggaa gcagccgaaa ggcugc
36

<210> 74
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 74
uuccgcguaa agagaggugc gg
22

<210> 75
[0028] <211> 36
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以被 2'-O-甲基核糖核苷酸修饰

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> 可以被硫代磷酸酯修饰

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> 可以被 2'-O-甲基核糖核苷酸修饰

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> 可以被 2'-氟-脱氧核糖核苷酸修饰

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(7)
<223> 可以被 2'-O-甲基核糖核苷酸修饰

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(10)
<223> 可以被 2'-氟-脱氧核糖核苷酸修饰

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以被 2'-O-甲基核糖核苷酸修饰

[0029]

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(13)
<223> 可以被 2'-氟-脱氧核糖核苷酸修饰

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(16)
<223> 可以被 2'-O-甲基核糖核苷酸修饰

<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(17)
<223> 可以被 2'-氟-脱氧核糖核苷酸修饰

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(26)
<223> 可以被 2'-O-甲基核糖核苷酸修饰

<220>
<221> misc_feature
<222> (27)..(27)
<223> 可以被 2'-修饰-GalNAc 鸟苷修饰

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(30)
<223> 可以被 2'-修饰-GalNAc 腺苷修饰

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(36)
<223> 可以被 2'-O-甲基核糖核苷酸修饰

<400> 75
gacaaaaauc cucacaauaa gcagccgaaa ggcugc
36

<210> 76
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
[0030] <223> 合成多核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以被 4'-O-单甲基膦酸酯-2'-O-甲基尿苷修饰

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(4)
<223> 可以被硫代磷酸酯修饰

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(3)
<223> 可以被 2'-氟-脱氧核糖核苷酸修饰

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> 可以被 2'-O-甲基核糖核苷酸修饰

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以被 2'-氟-脱氧核糖核苷酸修饰

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以被 2'-O-甲基核糖核苷酸修饰

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(8)
<223> 可以被 2'-氟-脱氧核糖核苷酸修饰

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以被 2'-O-甲基核糖核苷酸修饰

[0031]
<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以被 2'-氟-脱氧核糖核苷酸修饰

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以被 2'-O-甲基核糖核苷酸修饰

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以被 2'-氟-脱氧核糖核苷酸修饰

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以被 2'-O-甲基核糖核苷酸修饰

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)

<223> 可以被 2'-氟-脱氧核糖核苷酸修饰

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> 可以被 2'-O-甲基核糖核苷酸修饰

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> 可以被 2'-氟-脱氧核糖核苷酸修饰

<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(18)
<223> 可以被 2'-O-甲基核糖核苷酸修饰

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(19)
<223> 可以被 2'-氟-脱氧核糖核苷酸修饰

[0032]

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(22)
<223> 可以被 2'-O-甲基核糖核苷酸修饰

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(22)
<223> 可以被硫代磷酸酯修饰

<400> 76
uuauugugag gauuuuuugu cgg
23

<210> 77
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 77
tgttgacaag aatcctcaca atacctcgtg gtggacttct ctcaattttc
50

<210> 78
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 78
ggaacuguuu uuaggagugu uu
22

[0033]

<210> 79
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 79
ggaacuguuc uuaggagugu uu
22

<210> 80
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 80
ggcuguuuuu aggaguguua uu
22

<210> 81
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 81
ggcuguucuu aggaguguua uu
22

<210> 82
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

[0034] <400> 82
ttgacaagaa tcctcacaat ac
22

<210> 83
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 83
gggcaccacc ugaagagagu cu
22

<210> 84
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 84
gggcaccacc ugaagagagu uu
22

<210> 85
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 85
ctcgtggtgg acttctctca at
22

[0035] <210> 86
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 86
ggcaccaccu gaagagaguc au
22

<210> 87
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 87

ggcaccaccu gaagagaguu au
22

<210> 88
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 88
tcgtggtgga cttctctcaa tt
22

<210> 89
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

[0036]

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 89
ggcaccugaa gagagucaaa au
22

<210> 90
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 90
ggcaccugaa gagaguuaaa au
22

<210> 91

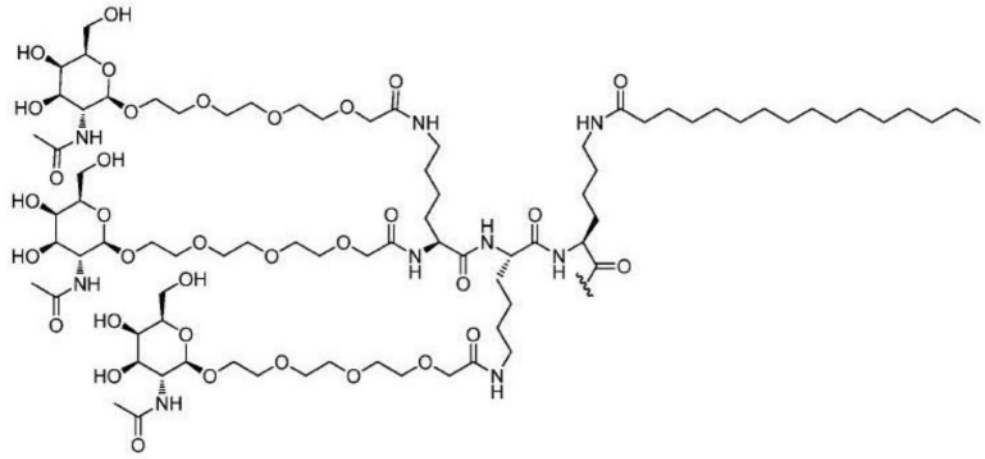
[0037]

<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 91
tggtggactt ctctcaattt tc
22

A1



A2

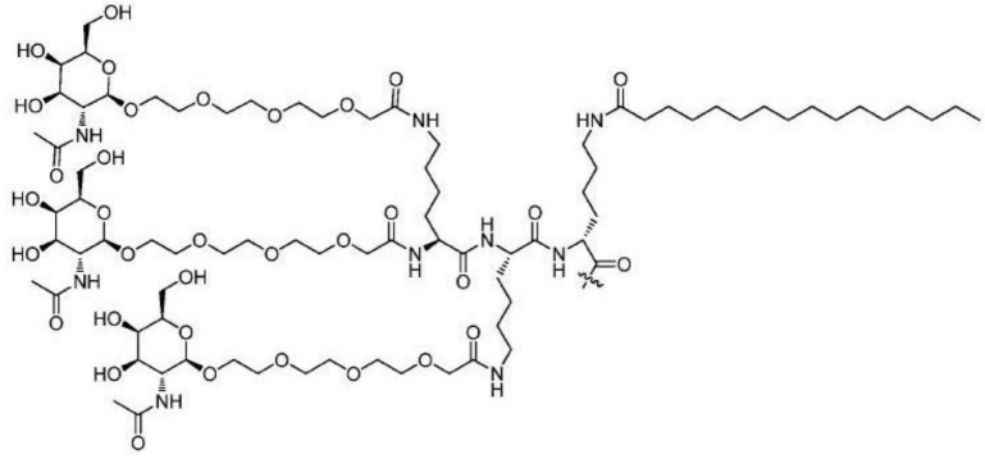
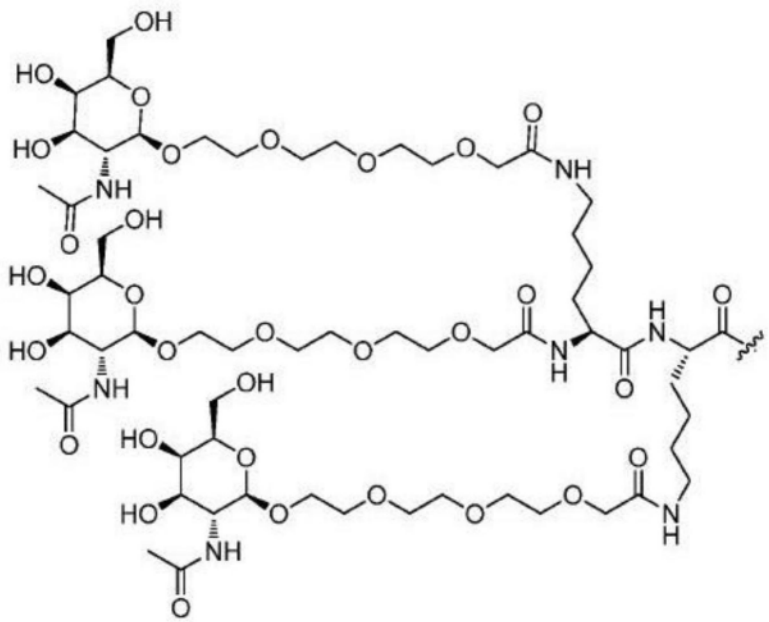


图1

B1



B2

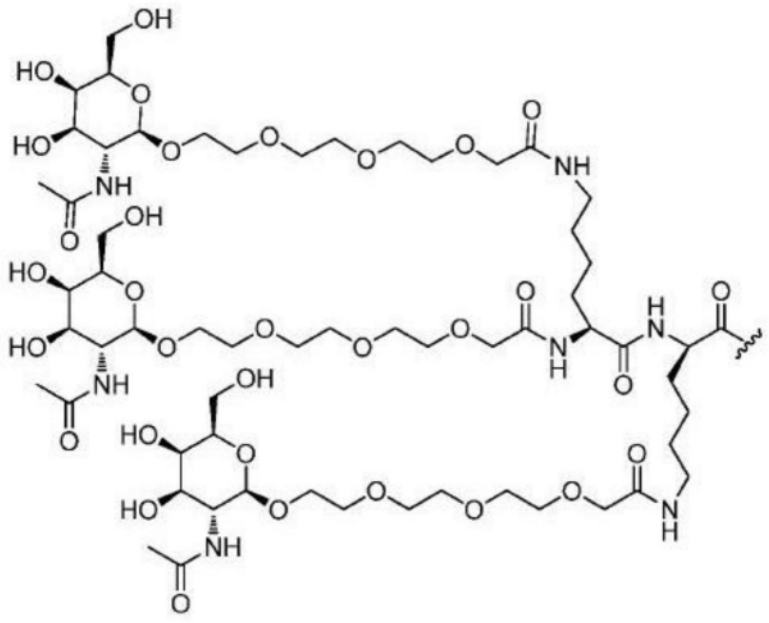
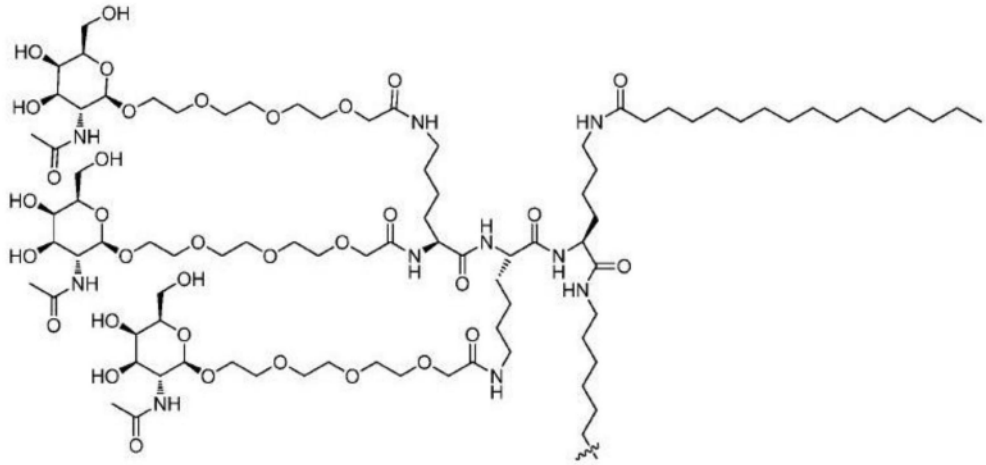


图1(续)

C1



C2

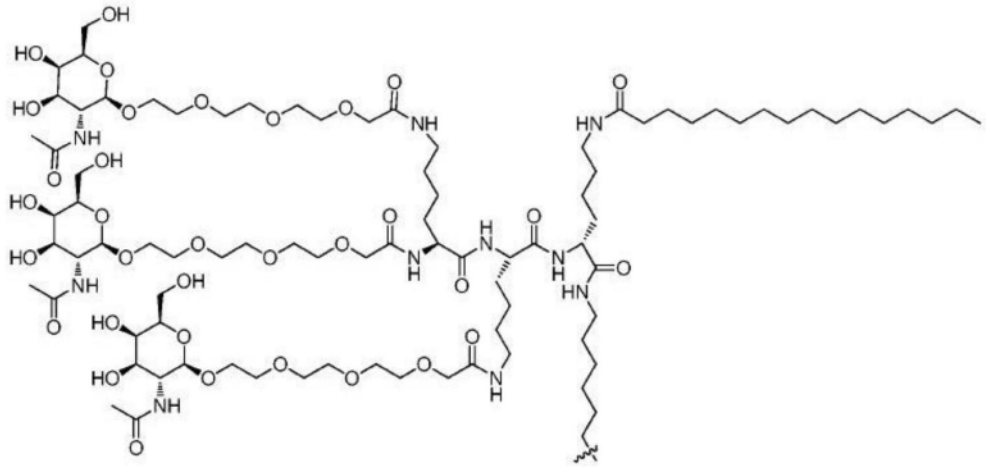
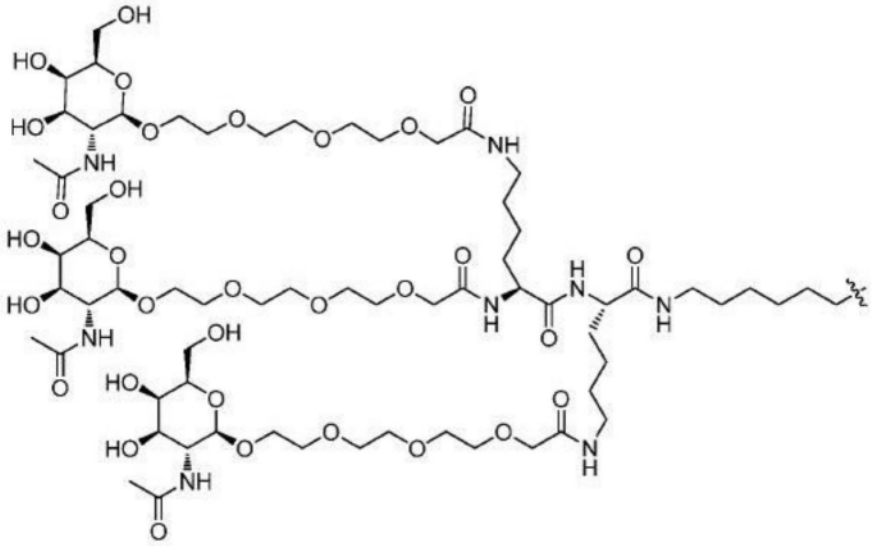


图1(续)

D1



D2

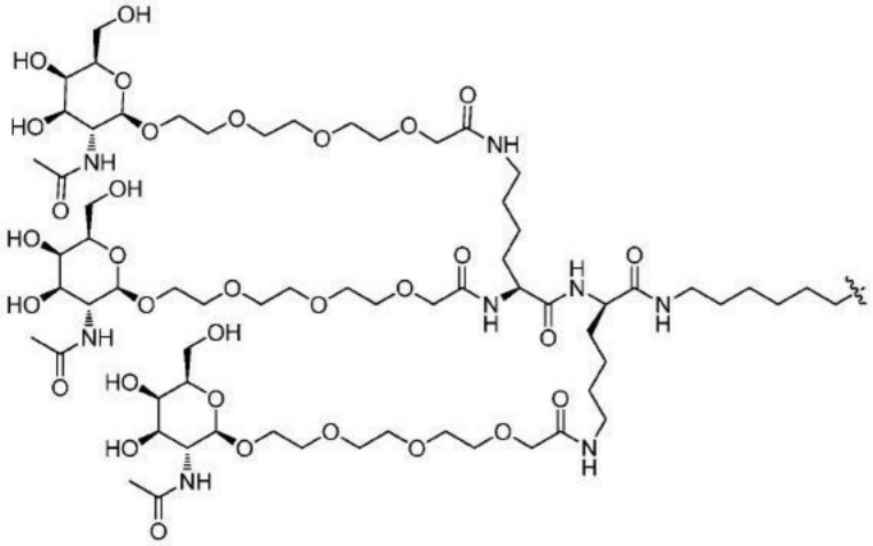
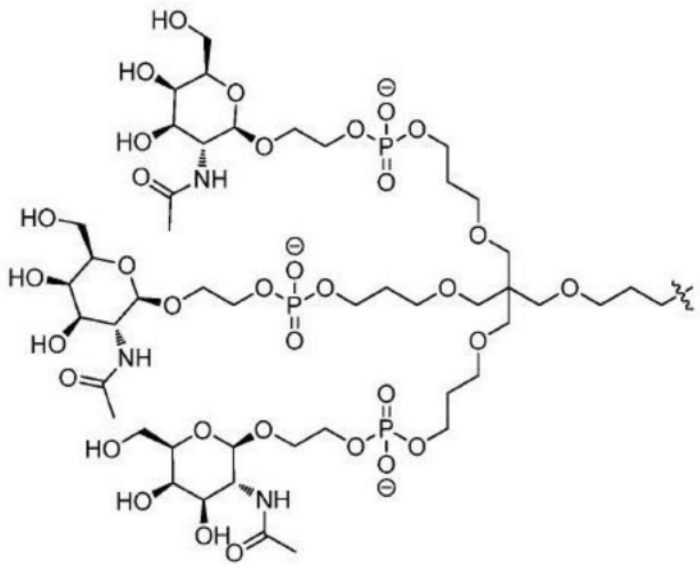


图1(续)

E1



F1

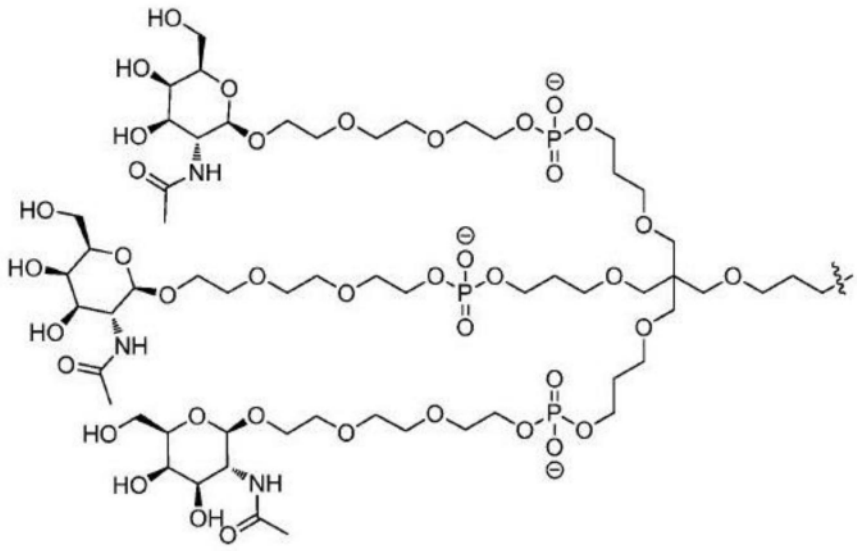


图1(续)

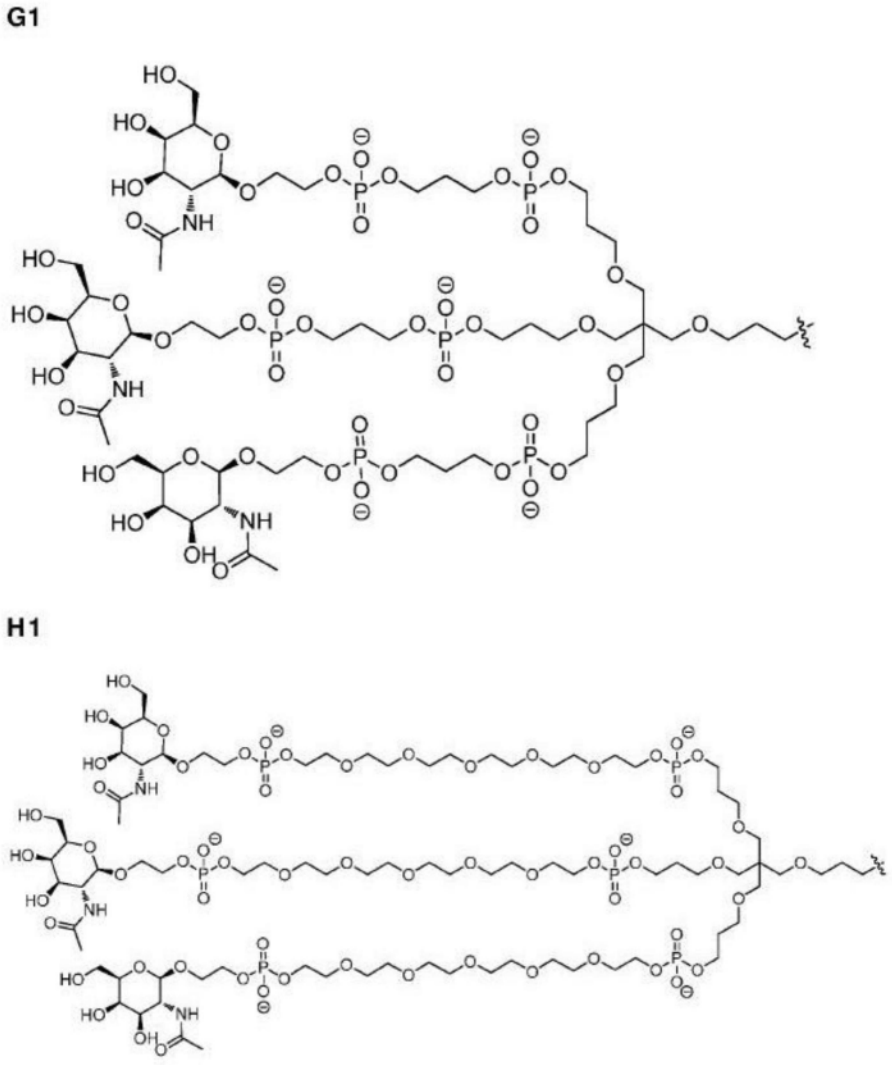
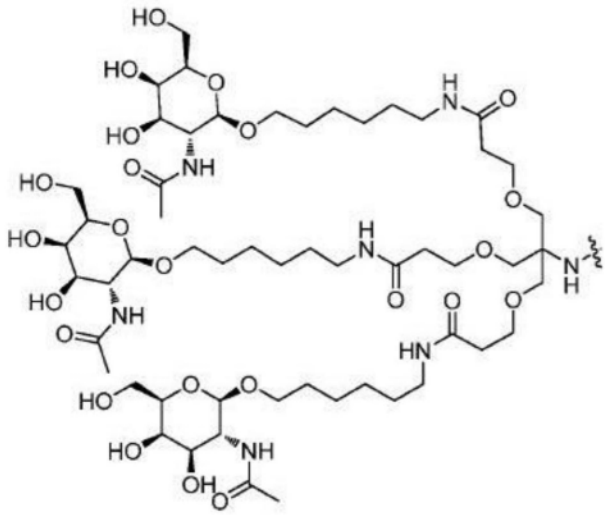


图1(续)

I1



J1

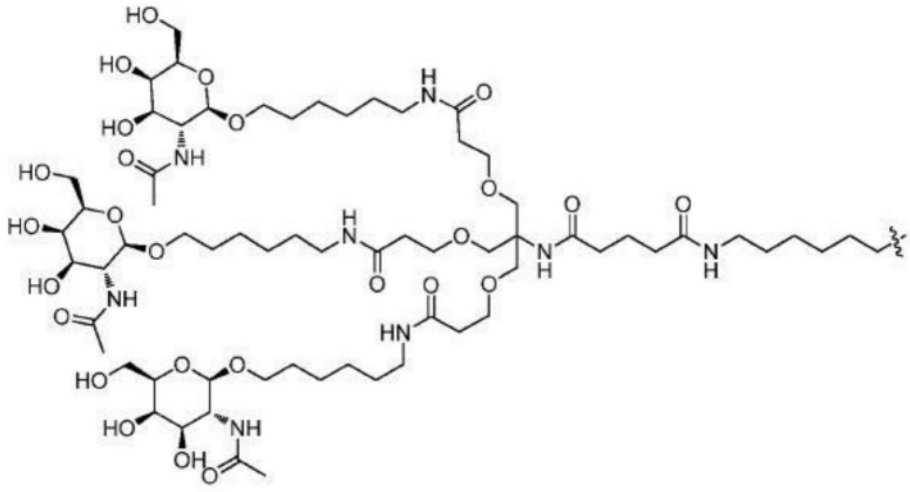


图1(续)

K1

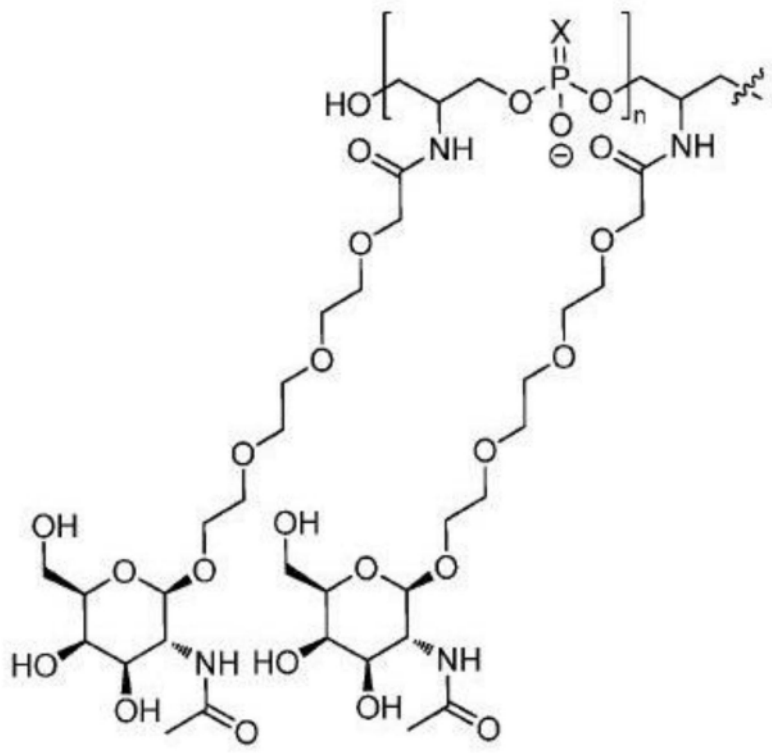


图1(续)

K2

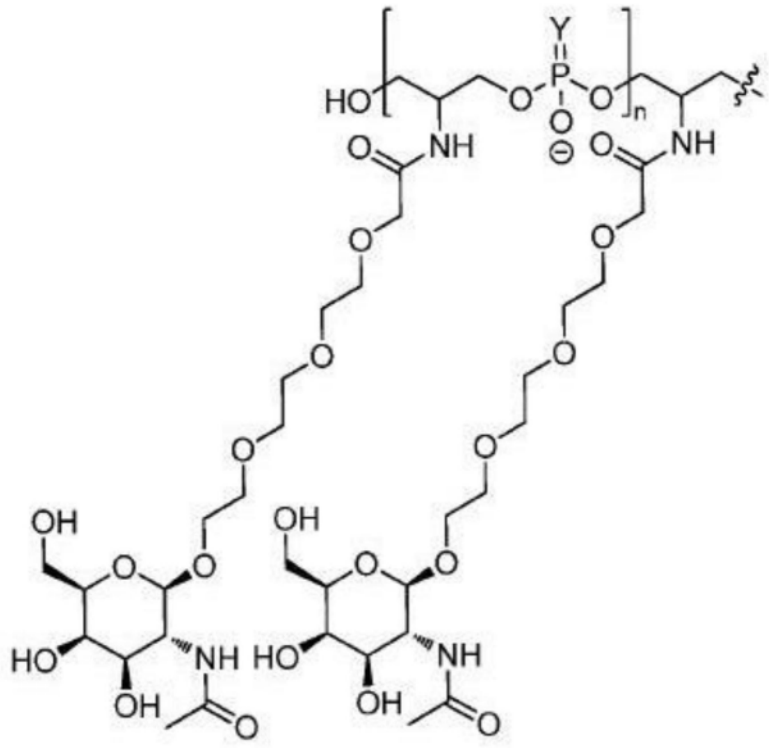


图1(续)

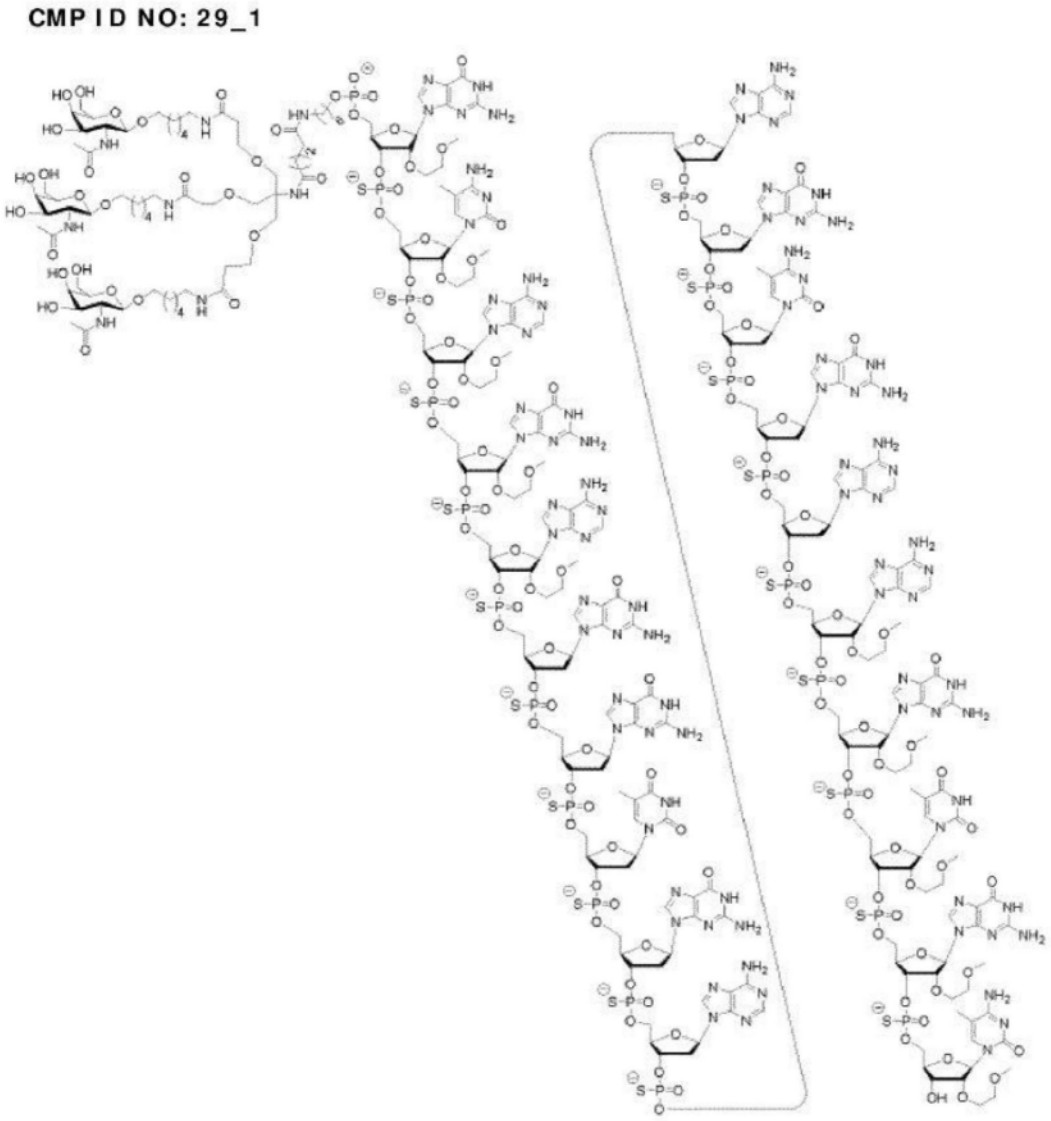


图2

COMP ID NO 23_1

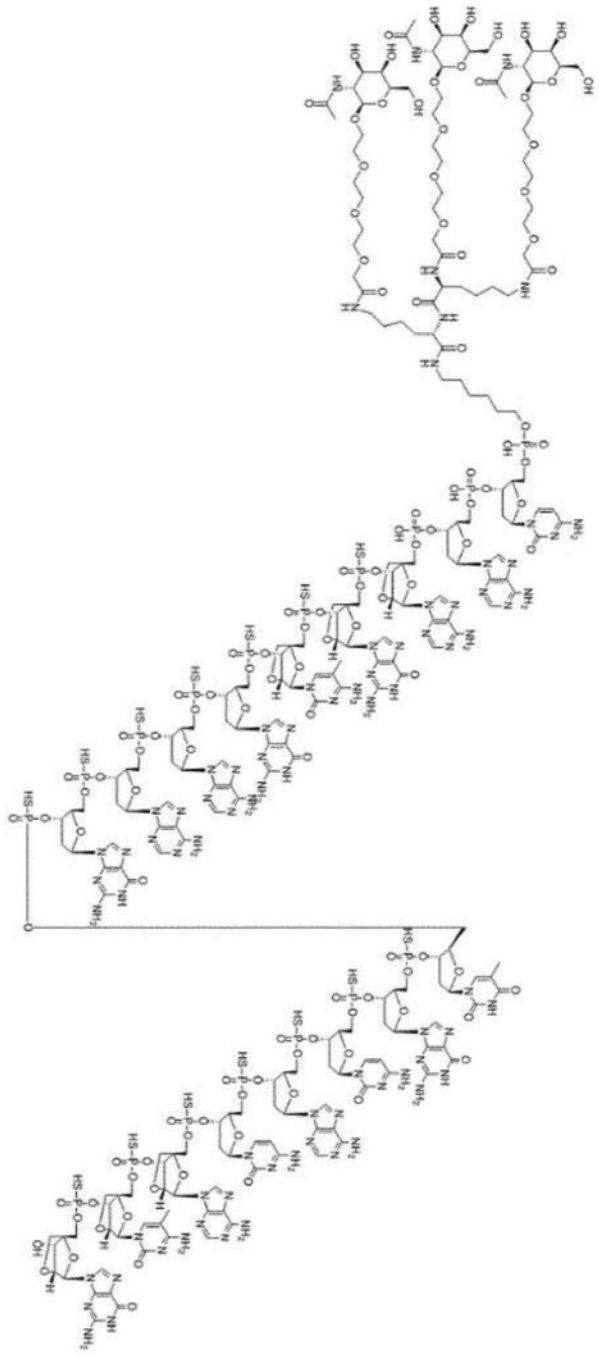


图3

COMP ID NO 16_1

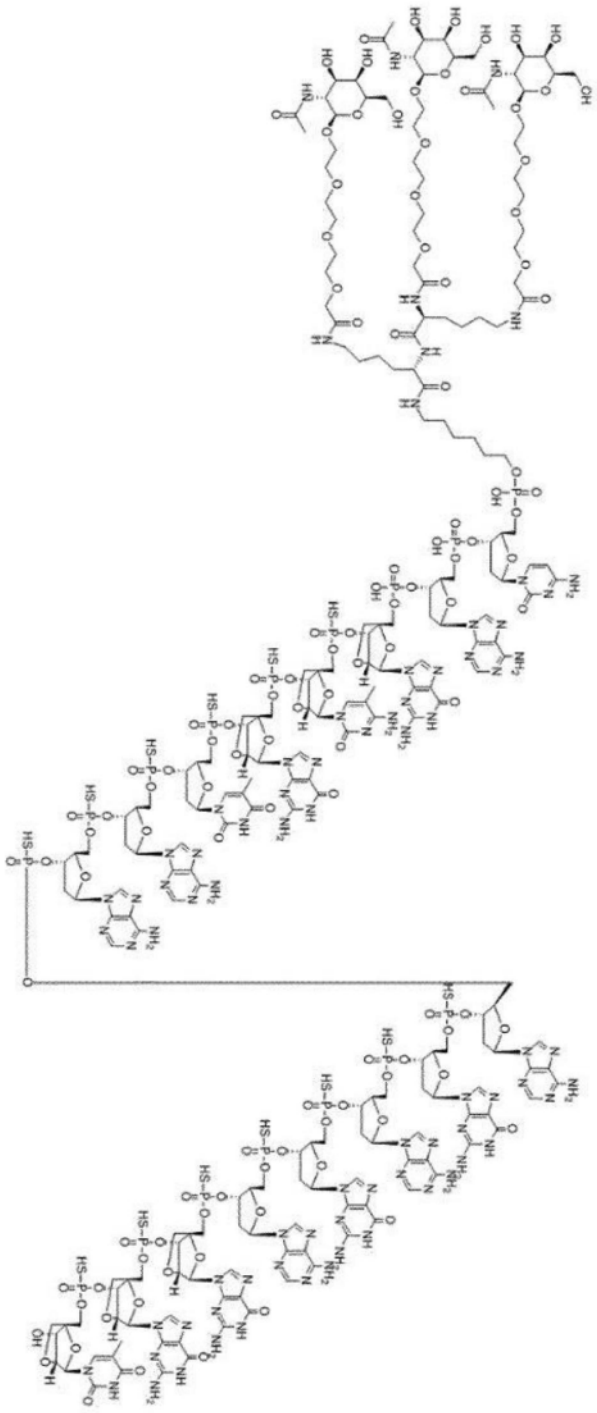


图4

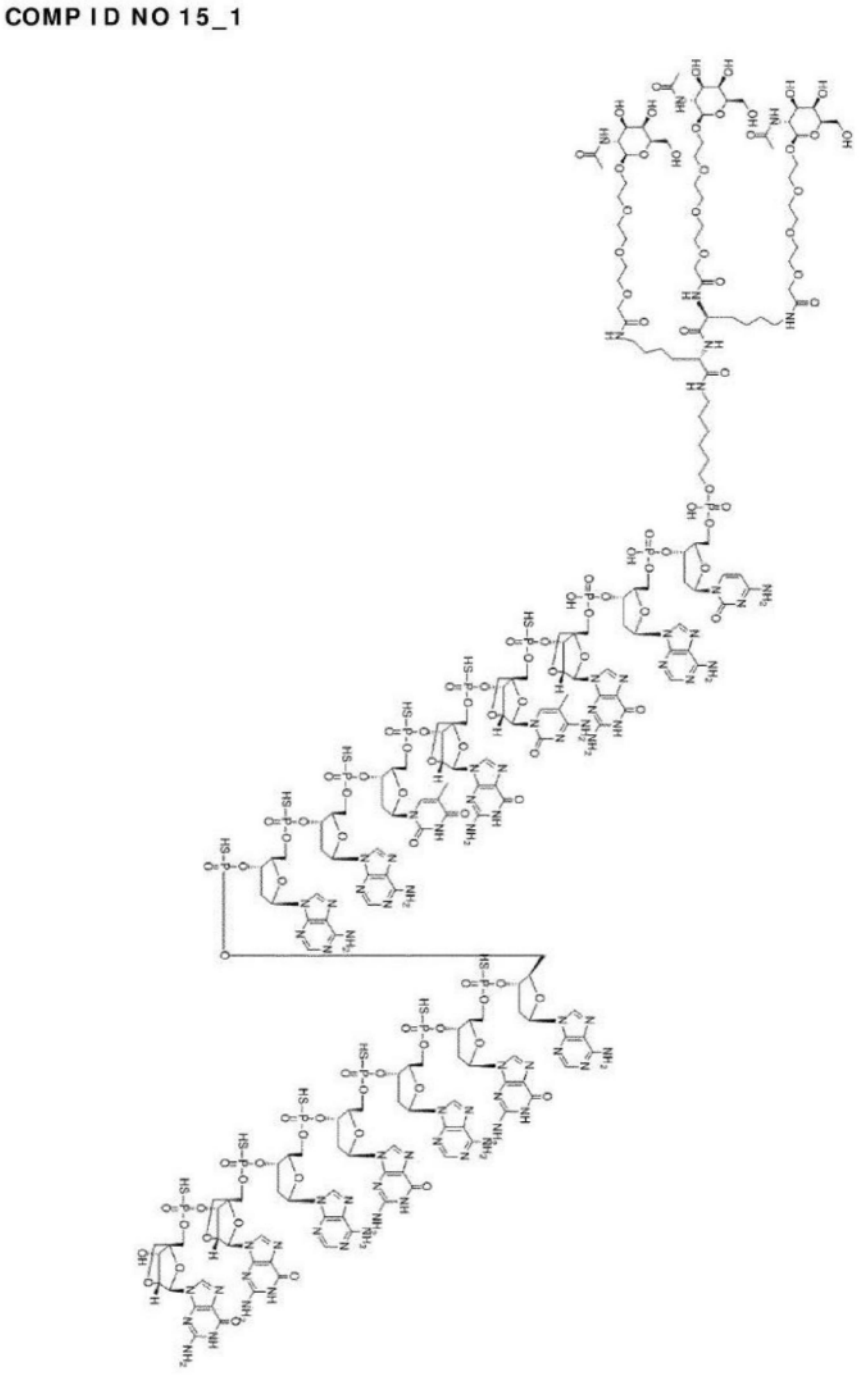


图5

COMP ID NO 15_2

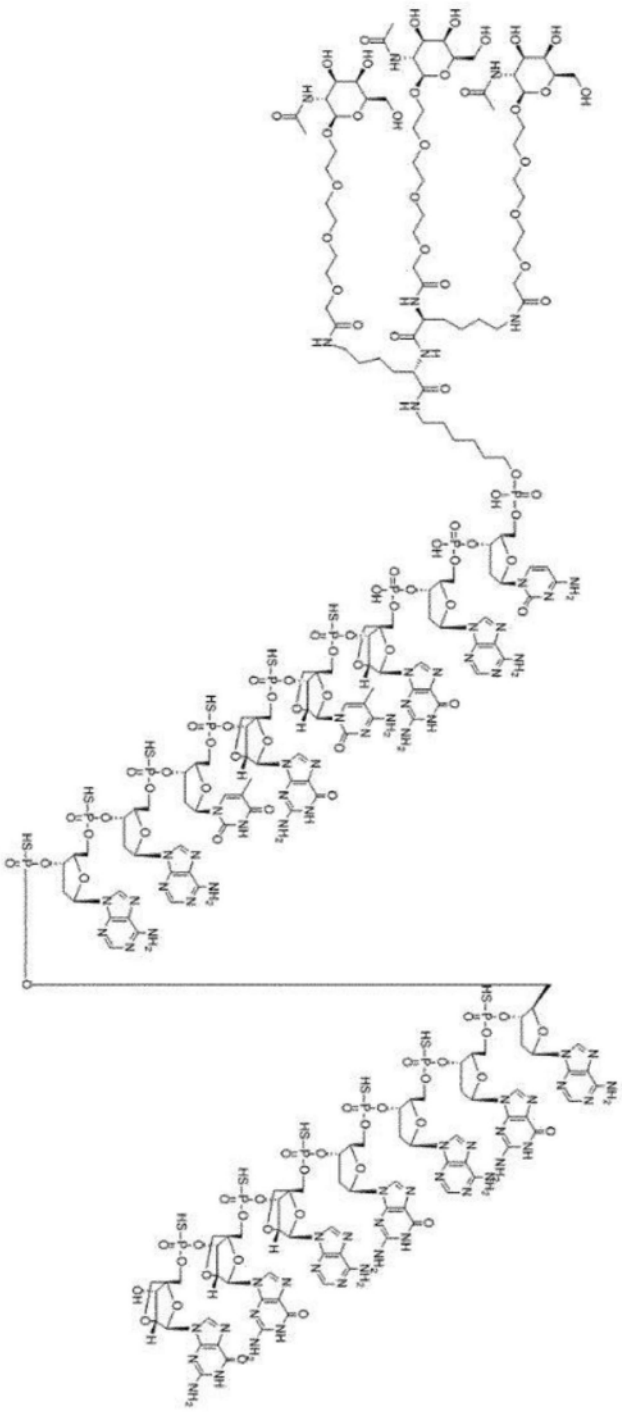


图6

COMP ID NO 26_1

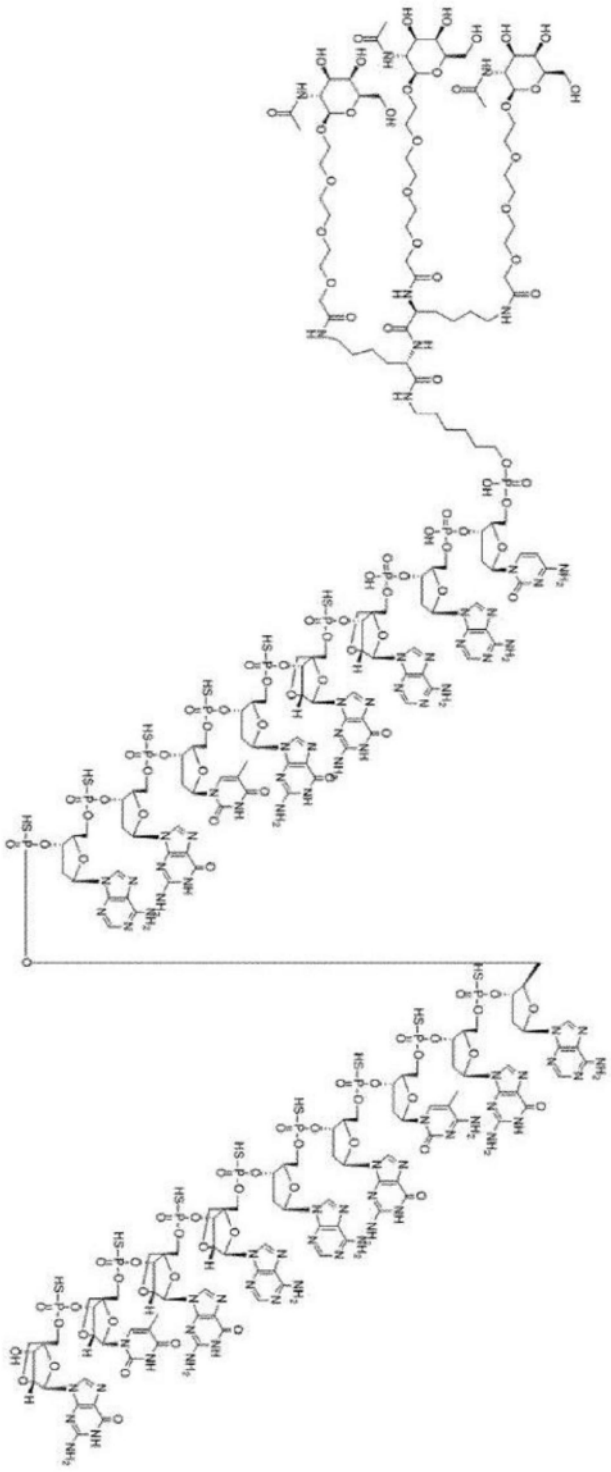


图7

COMP ID NO 20_1

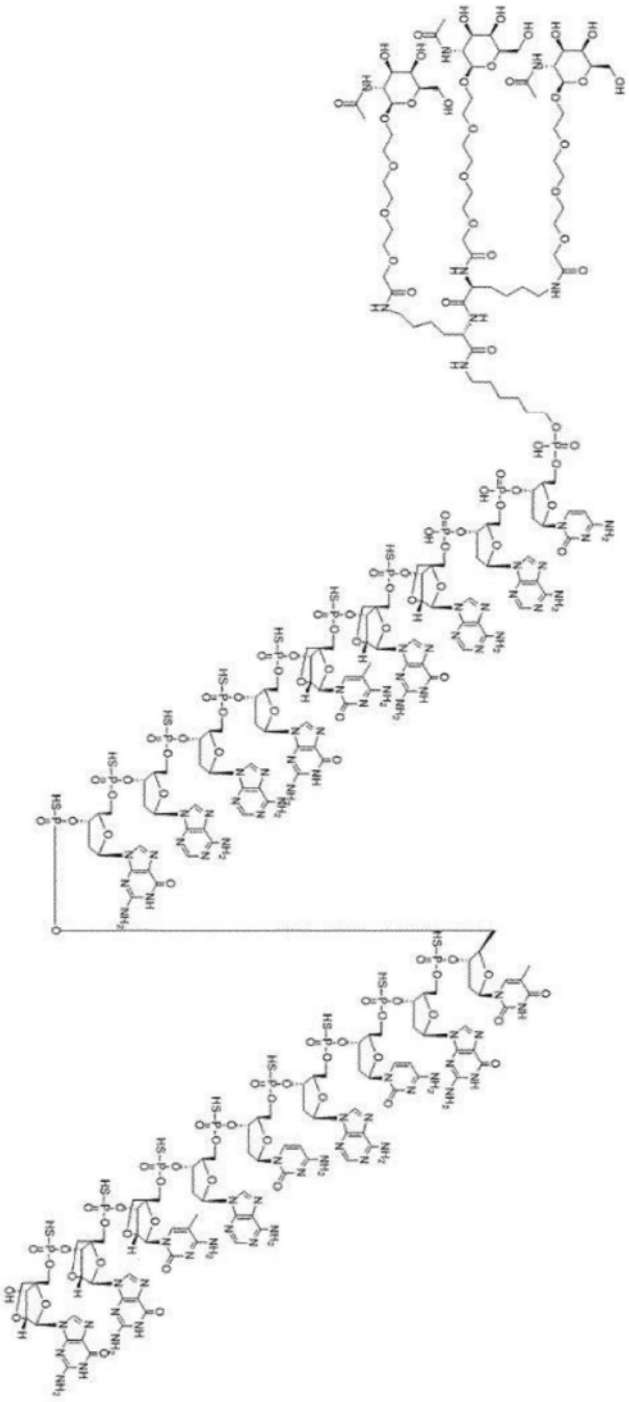
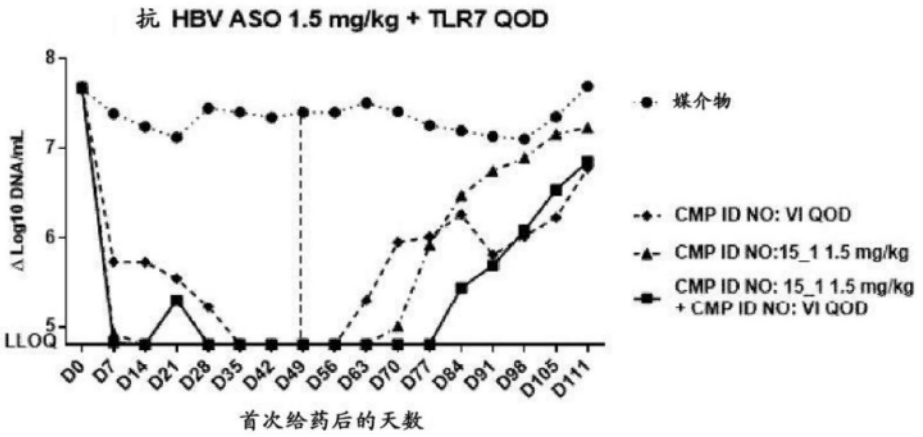


图8

A


抗 HBV ASO 1.5 mg/kg + TLR7 QOD
Δ Log10 DNA/mL
8
7
6
5
LLOQ
D0 D7 D14 D21 D28 D35 D42 D49 D56 D63 D70 D77 D84 D91 D98 D105 D111
首次给药后的天数
媒介物
CMP ID NO: VI QOD
CMP ID NO:15_1 1.5 mg/kg
CMP ID NO: 15_1 1.5 mg/kg
+ CMP ID NO: VI QOD

B

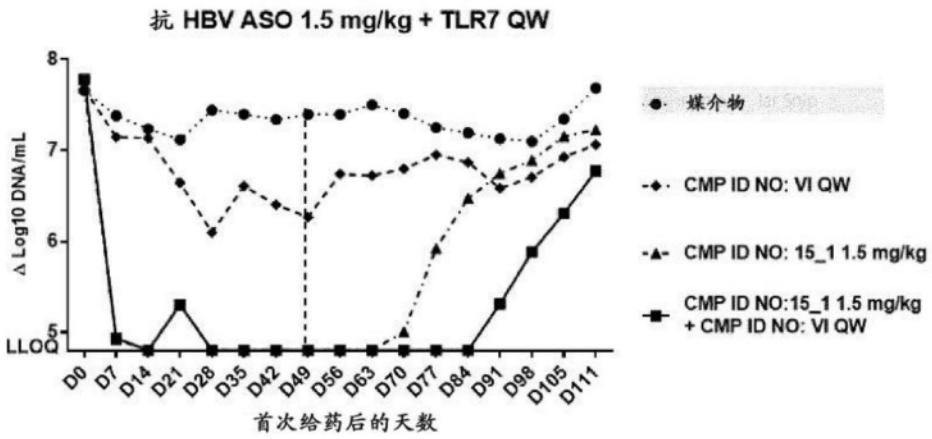
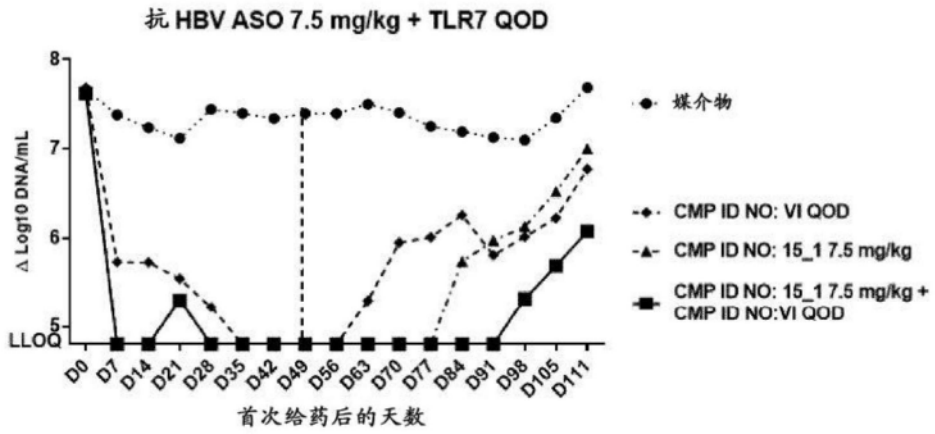

抗 HBV ASO 1.5 mg/kg + TLR7 QW
Δ Log10 DNA/mL
8
7
6
5
LLOQ
D0 D7 D14 D21 D28 D35 D42 D49 D56 D63 D70 D77 D84 D91 D98 D105 D111
首次给药后的天数
媒介物
CMP ID NO: VI QW
CMP ID NO: 15_1 1.5 mg/kg
CMP ID NO:15_1 1.5 mg/kg
+ CMP ID NO: VI QW

图9

C


抗 HBV ASO 7.5 mg/kg + TLR7 QOD
Δ Log10 DNA/mL
8
7
6
5
LLOQ
D0 D7 D14 D21 D28 D35 D42 D49 D56 D63 D70 D77 D84 D91 D98 D105 D111
首次给药后的天数
媒介物
CMP ID NO: VI QOD
CMP ID NO: 15_1 7.5 mg/kg
CMP ID NO: 15_1 7.5 mg/kg + CMP ID NO:VI QOD

D

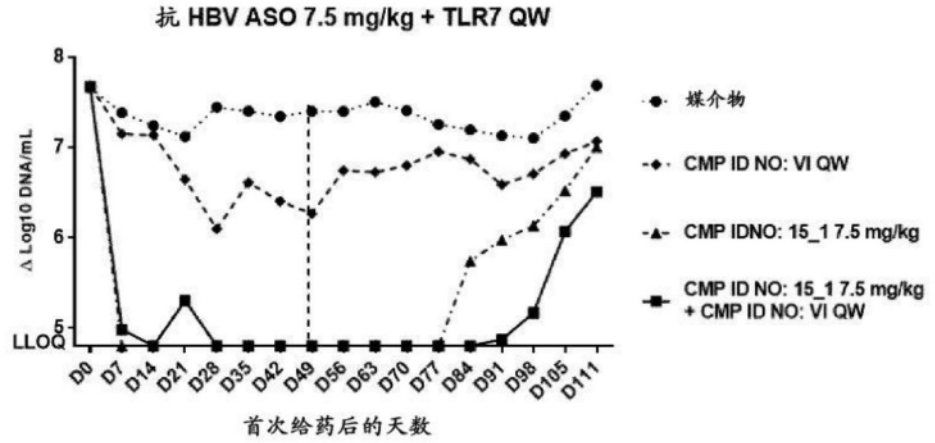

抗 HBV ASO 7.5 mg/kg + TLR7 QW
Δ Log10 DNA/mL
8
7
6
5
LLOQ
D0 D7 D14 D21 D28 D35 D42 D49 D56 D63 D70 D77 D84 D91 D98 D105 D111
首次给药后的天数
媒介物
CMP ID NO: VI QW
CMP IDNO: 15_1 7.5 mg/kg
CMP ID NO: 15_1 7.5 mg/kg + CMP ID NO: VI QW

图9(续)

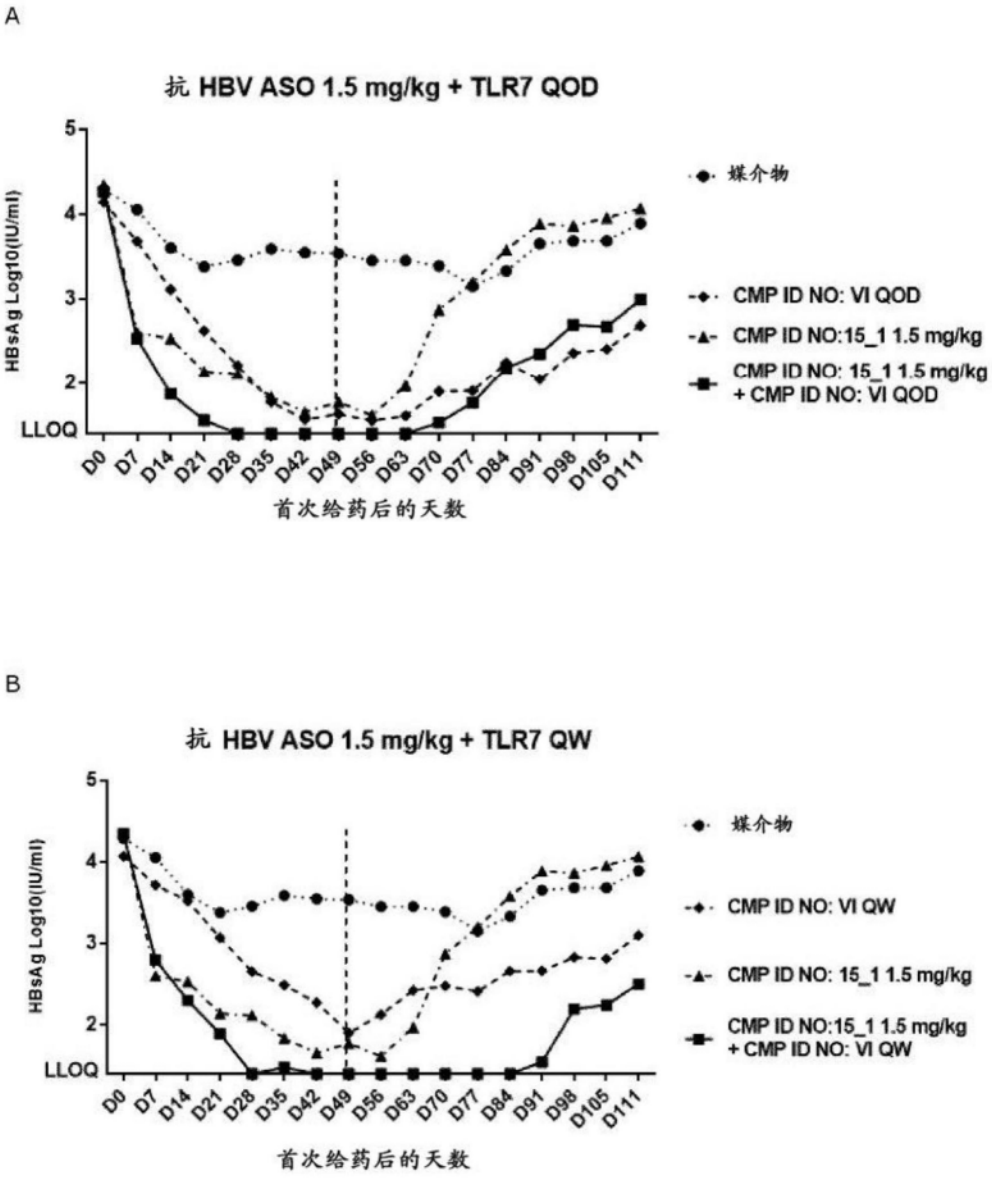
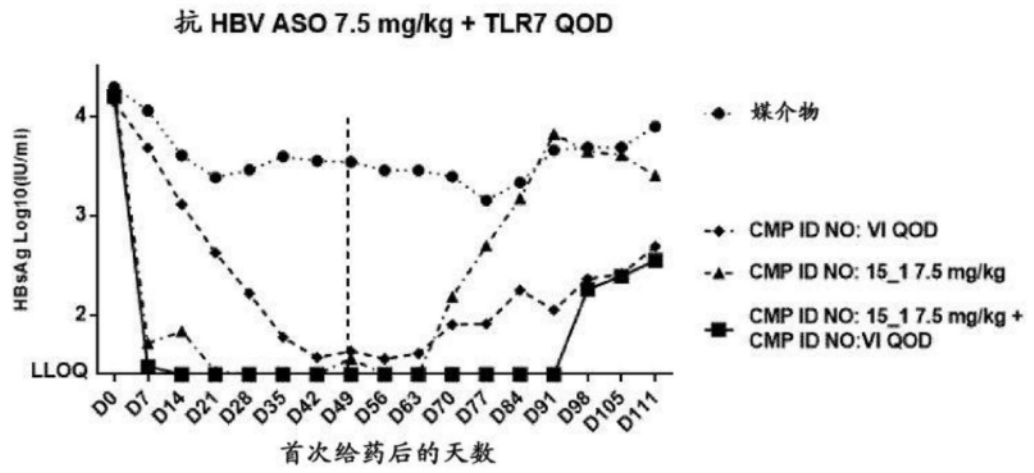

A
抗 HBV ASO 1.5 mg/kg + TLR7 QOD
HBsAg Log10(IU/ml)
5
4
3
2
LLOQ
D0 D7 D14 D21 D28 D35 D42 D49 D56 D63 D70 D77 D84 D91 D98 D105 D111
首次给药后的天数
媒介物
CMP ID NO: VI QOD
CMP ID NO:15_1 1.5 mg/kg
CMP ID NO: 15_1 1.5 mg/kg
+ CMP ID NO: VI QOD
B
抗 HBV ASO 1.5 mg/kg + TLR7 QW
HBsAg Log10(IU/ml)
5
4
3
2
LLOQ
D0 D7 D14 D21 D28 D35 D42 D49 D56 D63 D70 D77 D84 D91 D98 D105 D111
首次给药后的天数
媒介物
CMP ID NO: VI QW
CMP ID NO: 15_1 1.5 mg/kg
CMP ID NO:15_1 1.5 mg/kg
+ CMP ID NO: VI QW

图10

C


抗 HBV ASO 7.5 mg/kg + TLR7 QOD
HBsAg Log10(IU/ml)
4
3
2
LLOQ
D0 D7 D14 D21 D28 D35 D42 D49 D56 D63 D70 D77 D84 D91 D98 D105 D111
首次给药后的天数
媒介物
CMP ID NO: VI QOD
CMP ID NO: 15_1 7.5 mg/kg
CMP ID NO: 15_1 7.5 mg/kg + CMP ID NO:VI QOD

D

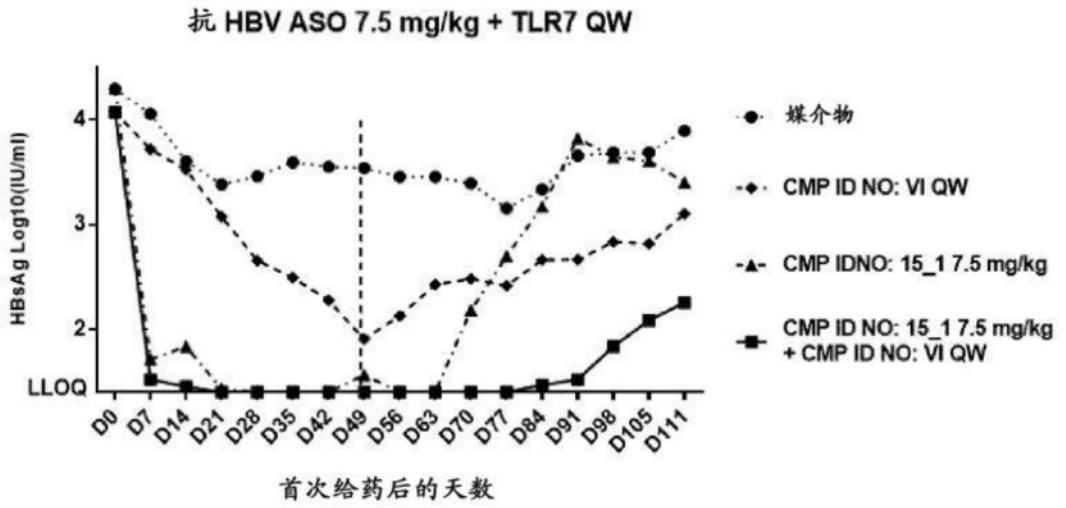

抗 HBV ASO 7.5 mg/kg + TLR7 QW
HBsAg Log10(IU/ml)
4
3
2
LLOQ
D0 D7 D14 D21 D28 D35 D42 D49 D56 D63 D70 D77 D84 D91 D98 D105 D111
首次给药后的天数
媒介物
CMP ID NO: VI QW
CMP IDNO: 15_1 7.5 mg/kg
CMP ID NO: 15_1 7.5 mg/kg + CMP ID NO: VI QW

图10(续)

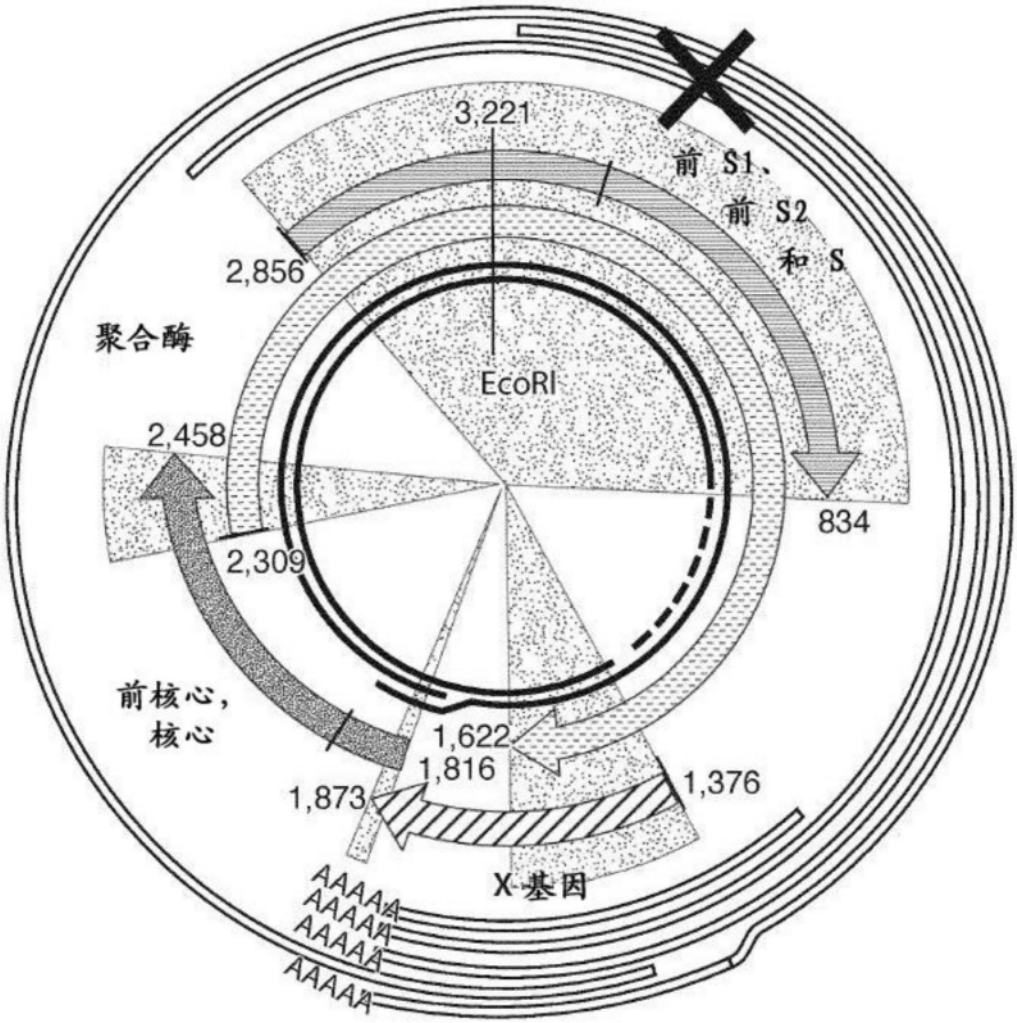

3,221
前 S1、
前 S2
和 S
2,856
聚合酶
EcoRI
2,458
2,309
834
前核心，
核心
1,622
1,816
1,873
1,376
X 基因
AAAAA
AAAAA
AAAAA
AAAAA

图11

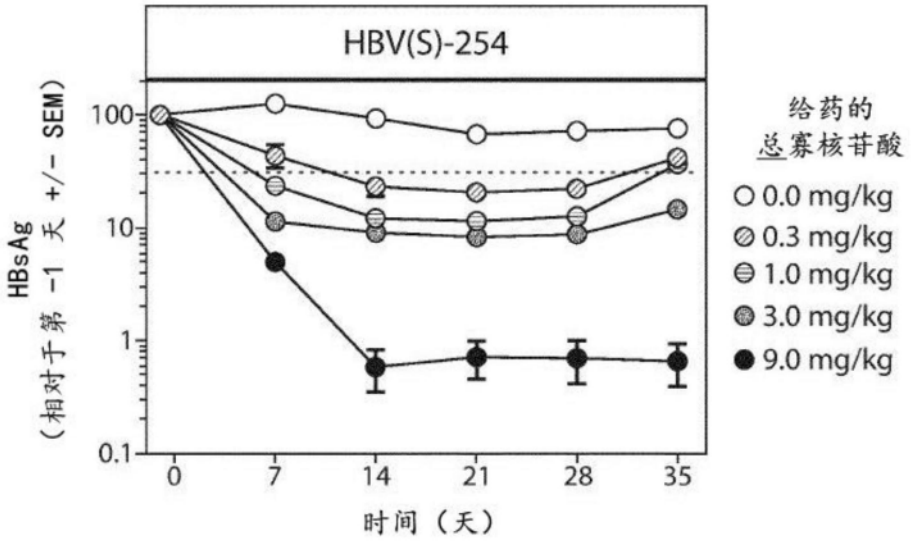

HBV(S)-254
HBsAg
（相对于第 -1 天 +/- SEM）
100
10
1
0.1
0
7
14
21
28
35
时间（天）
给药的
总寡核苷酸
0.0 mg/kg
0.3 mg/kg
1.0 mg/kg
3.0 mg/kg
9.0 mg/kg

图12

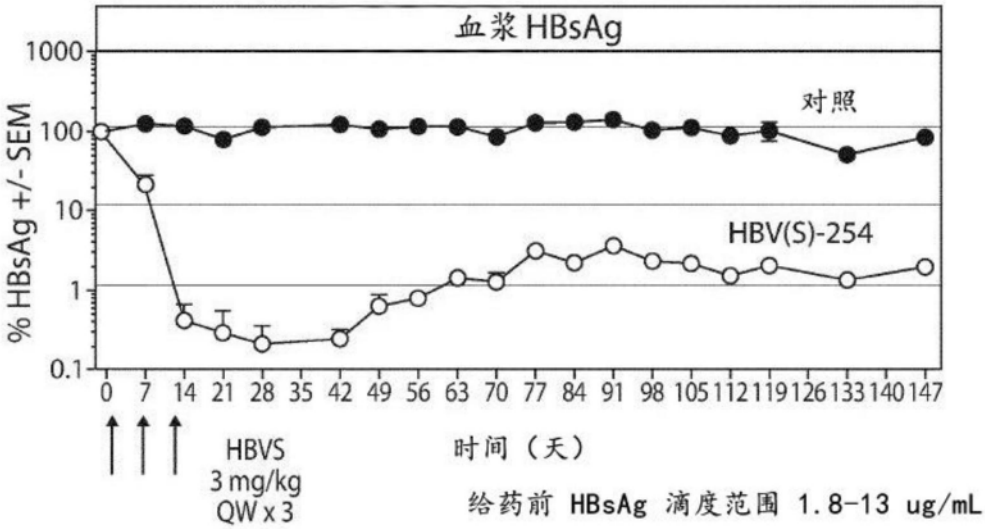

血浆 HBsAg
1000
100
10
1
0.1
% HBsAg +/- SEM
对照
HBV(S)-254
0 7 14 21 28 35 42 49 56 63 70 77 84 91 98 105 112 119 126 133 140 147
HBVS
3 mg/kg
QW x 3
时间（天）
给药前 HBsAg 滴度范围 1.8-13 ug/mL

图13

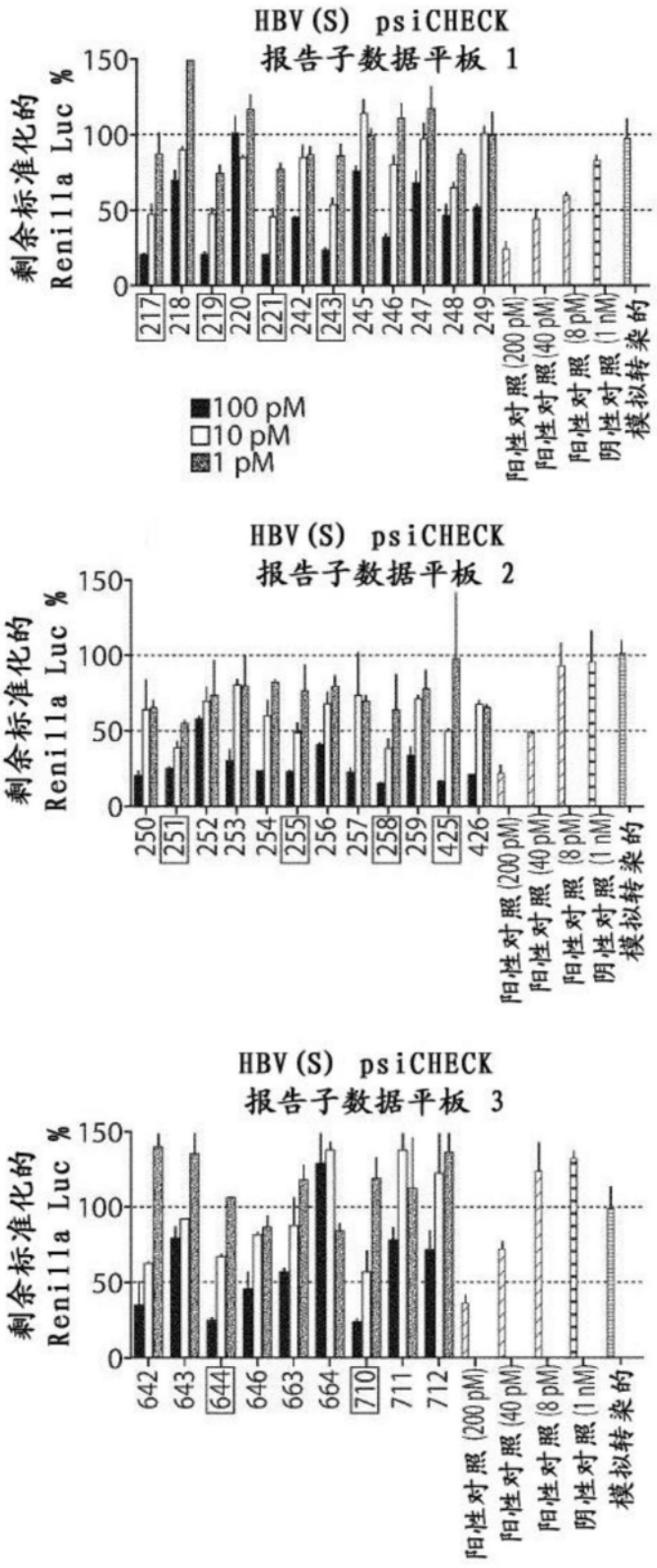

HBV(S) psiCHECK
报告子数据平板 1
剩余标准化的
Renilla Luc %
150
100
50
0
217
218
219
220
221
242
243
245
246
247
248
249
100 pM
10 pM
1 pM
阳性对照(200 pM)
阳性对照(40 pM)
阳性对照(8 pM)
阴性对照(1 nM)
模拟转染的
HBV(S) psiCHECK
报告子数据平板 2
剩余标准化的
Renilla Luc %
150
100
50
0
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
425
426
阳性对照(200 pM)
阳性对照(40 pM)
阳性对照(8 pM)
阴性对照(1 nM)
模拟转染的
HBV(S) psiCHECK
报告子数据平板 3
剩余标准化的
Renilla Luc %
150
100
50
0
642
643
644
646
663
664
710
711
712
阳性对照(200 pM)
阳性对照(40 pM)
阳性对照(8 pM)
阴性对照(1 nM)
模拟转染的

图14

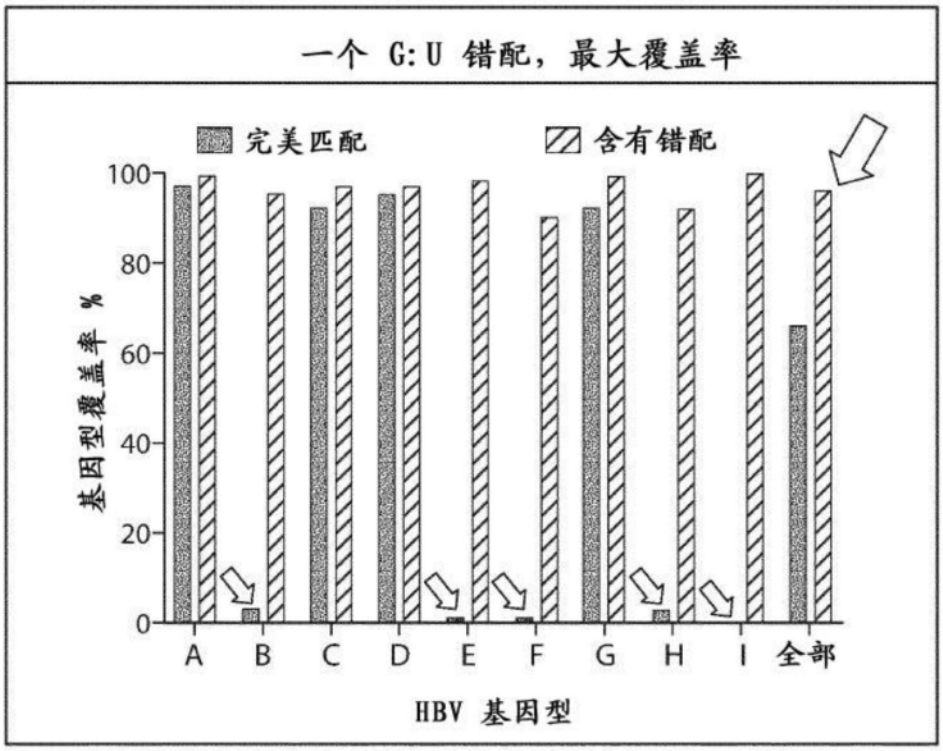

一个 G:U 错配，最大覆盖率
完美匹配
含有错配
基因型覆盖率 %
100
80
60
40
20
0
A
B
C
D
E
F
G
H
I
全部
HBV 基因型

图15

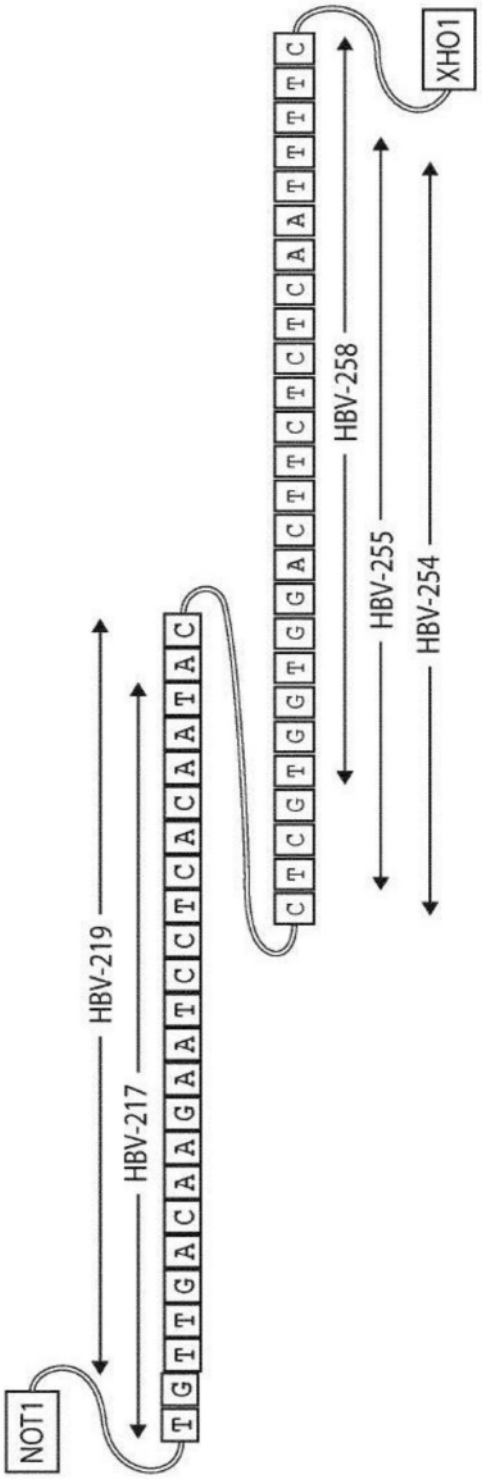


图16

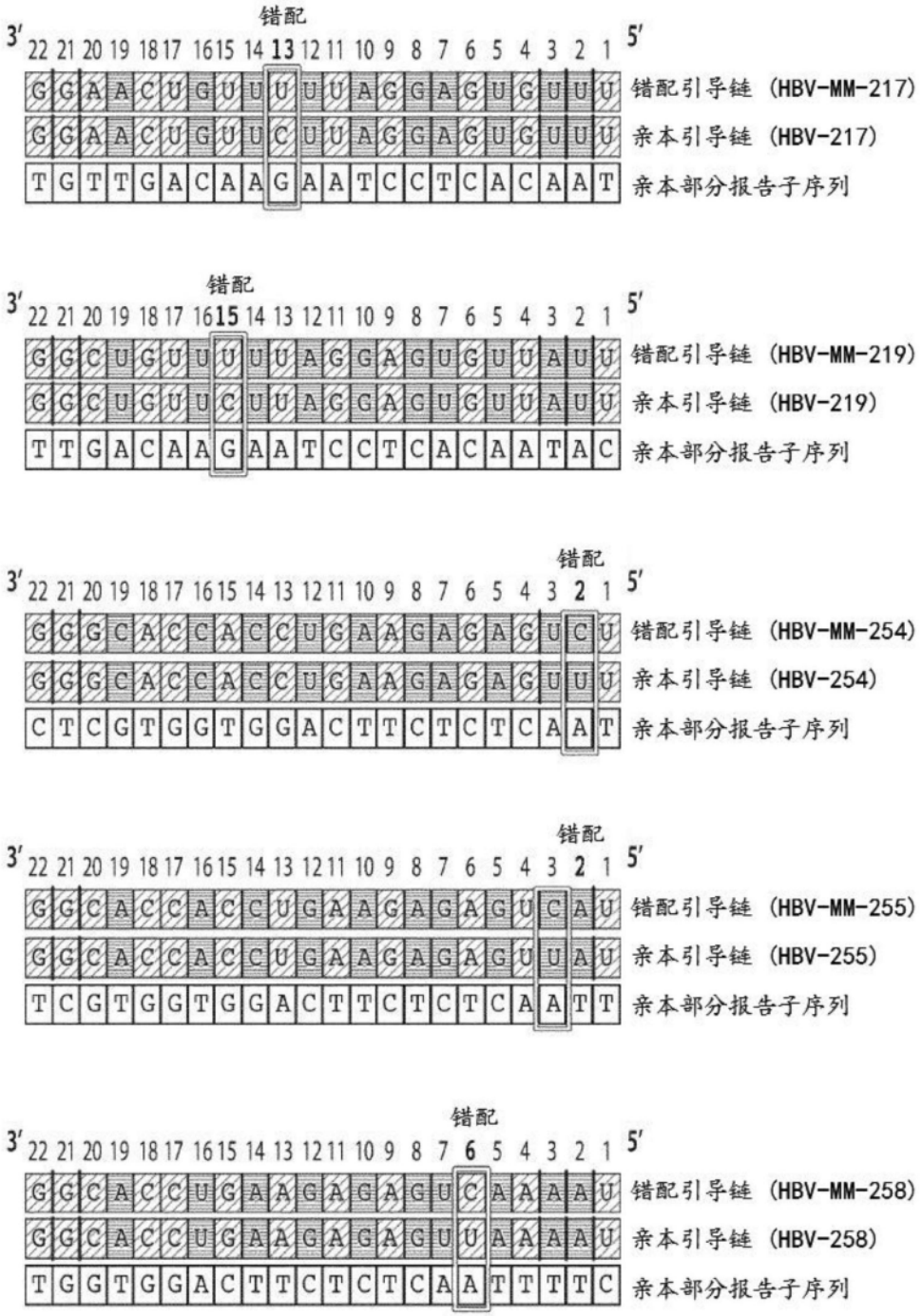

错配
3′ 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1 5′
G G A A C U G U U U U U A G G A G U G U U U 错配引导链 (HBV-MM-217)
G G A A C U G U U C U U A G G A G U G U U U 亲本引导链 (HBV-217)
T G T T G A C A A G A A T C C T C A C A A T 亲本部分报告子序列
错配
3′ 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1 5′
G G C U G U U U U U U A G G A G U G U U A U U 错配引导链 (HBV-MM-219)
G G C U G U U C U U A G G A G U G U U A U U 亲本引导链 (HBV-219)
T T G A C A A G A A T C C T C A C A A T A C 亲本部分报告子序列
错配
3′ 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1 5′
G G G C A C C A C C U G A A G A G A G U C U 错配引导链 (HBV-MM-254)
G G G C A C C A C C U G A A G A G A G U U U 亲本引导链 (HBV-254)
C T C G T G G T G G A C T T C T C T C A A T 亲本部分报告子序列
错配
3′ 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1 5′
G G C A C C A C C U G A A G A G A G U C A U 错配引导链 (HBV-MM-255)
G G C A C C A C C U G A A G A G A G U U A U 亲本引导链 (HBV-255)
T C G T G G T G G A C T T C T C T C A A T T 亲本部分报告子序列
错配
3′ 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1 5′
G G C A C C U G A A G A G A G U C A A A A U 错配引导链 (HBV-MM-258)
G G C A C C U G A A G A G A G U U A A A A U 亲本引导链 (HBV-258)
T G G T G G A C T T C T C T C A A T T T T C 亲本部分报告子序列

图17

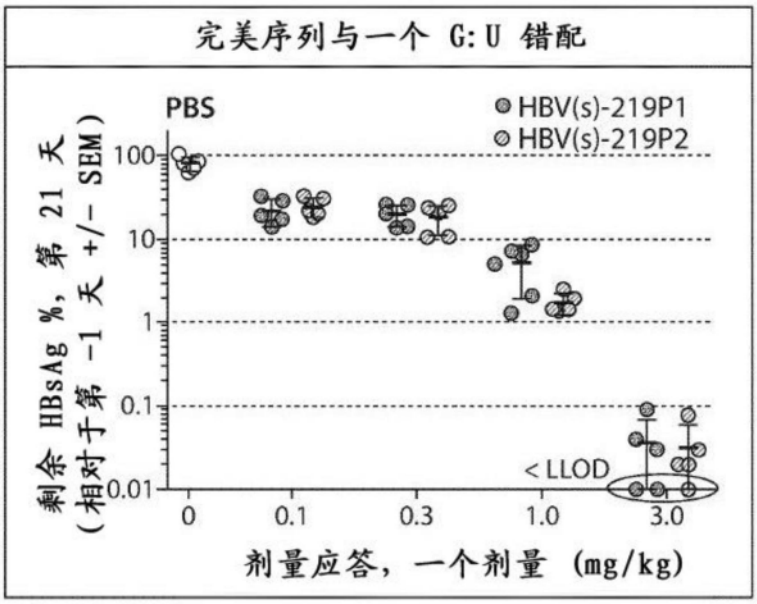

完美序列与一个 G:U 错配
PBS
HBV(s)-219P1
HBV(s)-219P2
剩余 HBsAg %，第 21 天
（相对于第 -1 天 +/- SEM）
100
10
1
0.1
0.01
< LLOD
0
0.1
0.3
1.0
3.0
剂量应答，一个剂量 (mg/kg)

图18

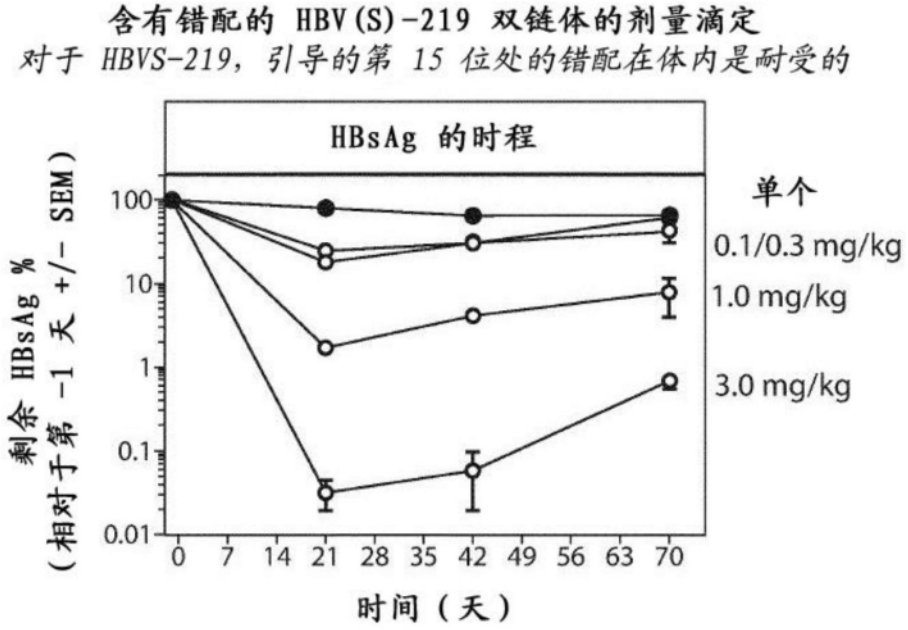

含有错配的 HBV(S)-219 双链体的剂量滴定
对于 HBVS-219，引导的第 15 位处的错配在体内是耐受的
HBsAg 的时程
剩余 HBsAg %
（相对于第 -1 天 +/- SEM）
100
10
1
0.1
0.01
0 7 14 21 28 35 42 49 56 63 70
时间（天）
单个
0.1/0.3 mg/kg
1.0 mg/kg
3.0 mg/kg

图19

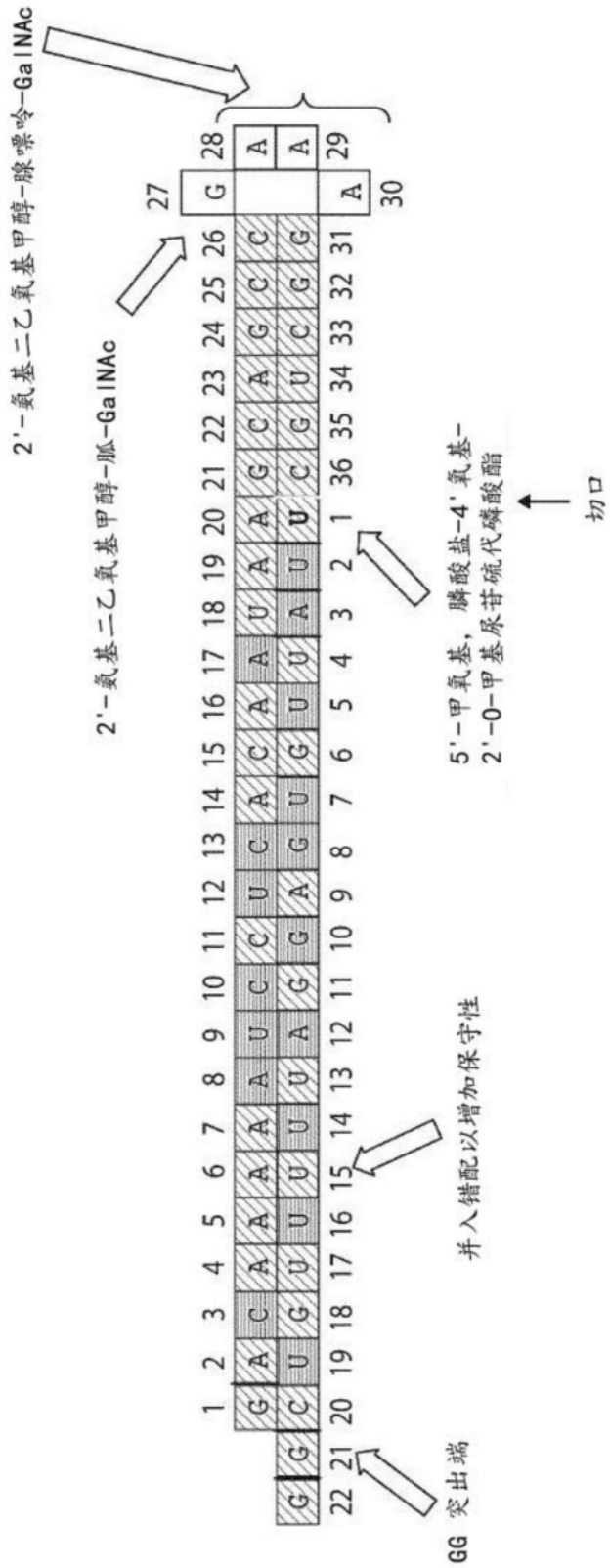

2'-氨基二乙氧基甲醇-腺嘌呤-GalNAc
2'-氨基二乙氧基甲醇-胍-GalNAc
5'-甲氧基，膦酸盐-4'氧基-
2'-O-甲基尿苷硫代磷酸酯
切口
并入错配以增加保守性
GG 突出端

图20

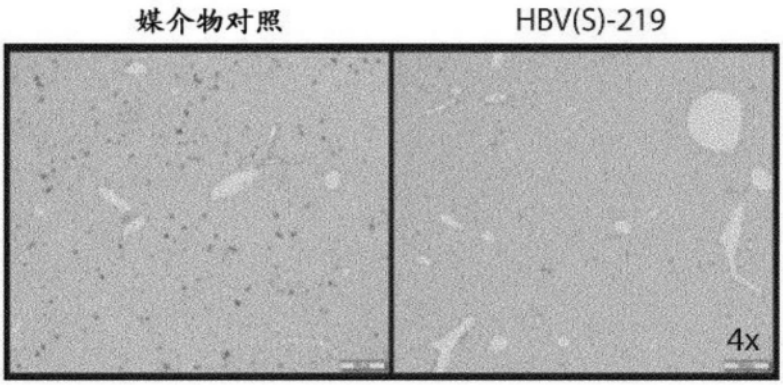

媒介物对照
HBV(S)-219
4x

图21A

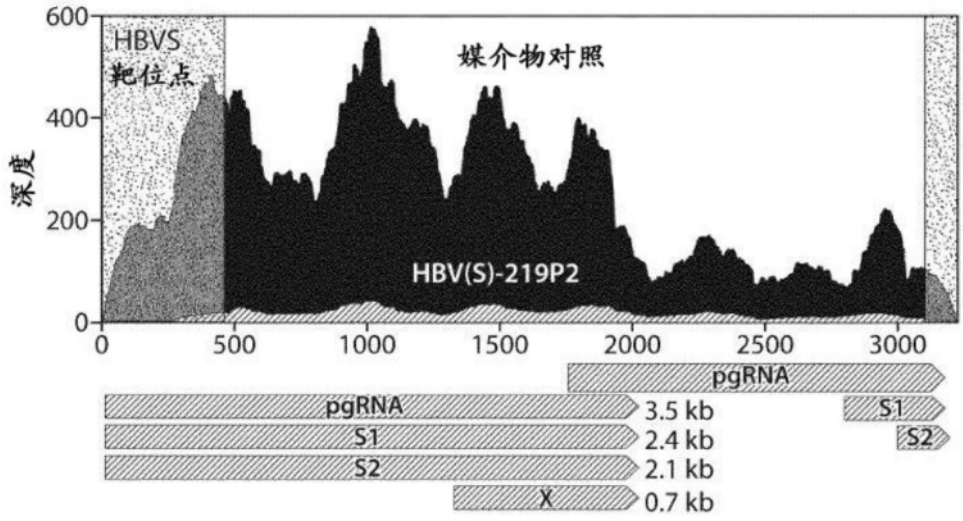

600
400
200
0
深度
HBVS
靶位点
媒介物对照
HBV(S)-219P2
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
pgRNA
pgRNA
S1
S2
X
3.5 kb
2.4 kb
2.1 kb
0.7 kb
S1
S2

图21B

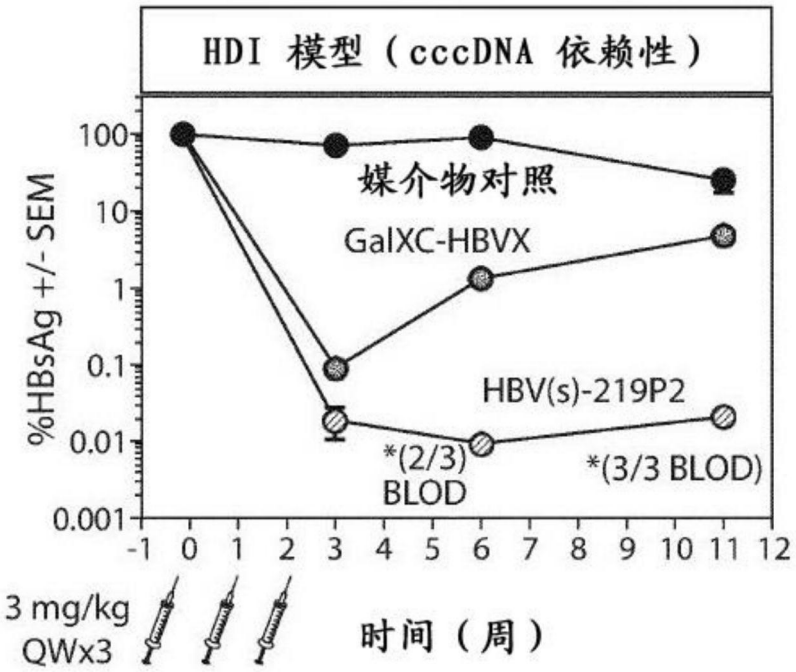

HDI 模型（cccDNA 依赖性）
%HBsAg +/- SEM
100
10
1
0.1
0.01
0.001
媒介物对照
GalXC-HBVX
HBV(s)-219P2
*(2/3)
BLOD
*(3/3 BLOD)
-1 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
3 mg/kg
QWx3
时间（周）

图22A

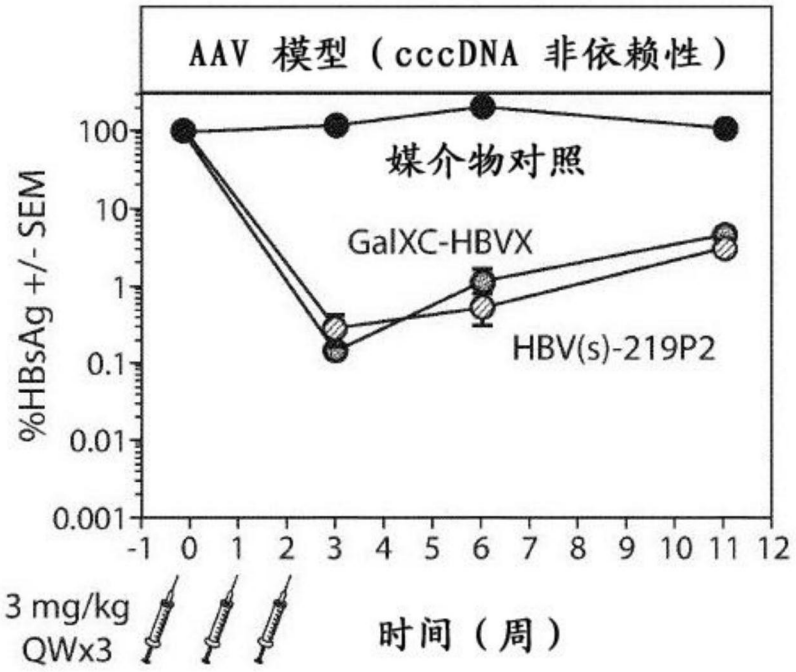

AAV 模型（cccDNA 非依赖性）
%HBsAg +/- SEM
100
10
1
0.1
0.01
0.001
媒介物对照
GalXC-HBVX
HBV(s)-219P2
-1 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
3 mg/kg
QWx3
时间（周）

图22B

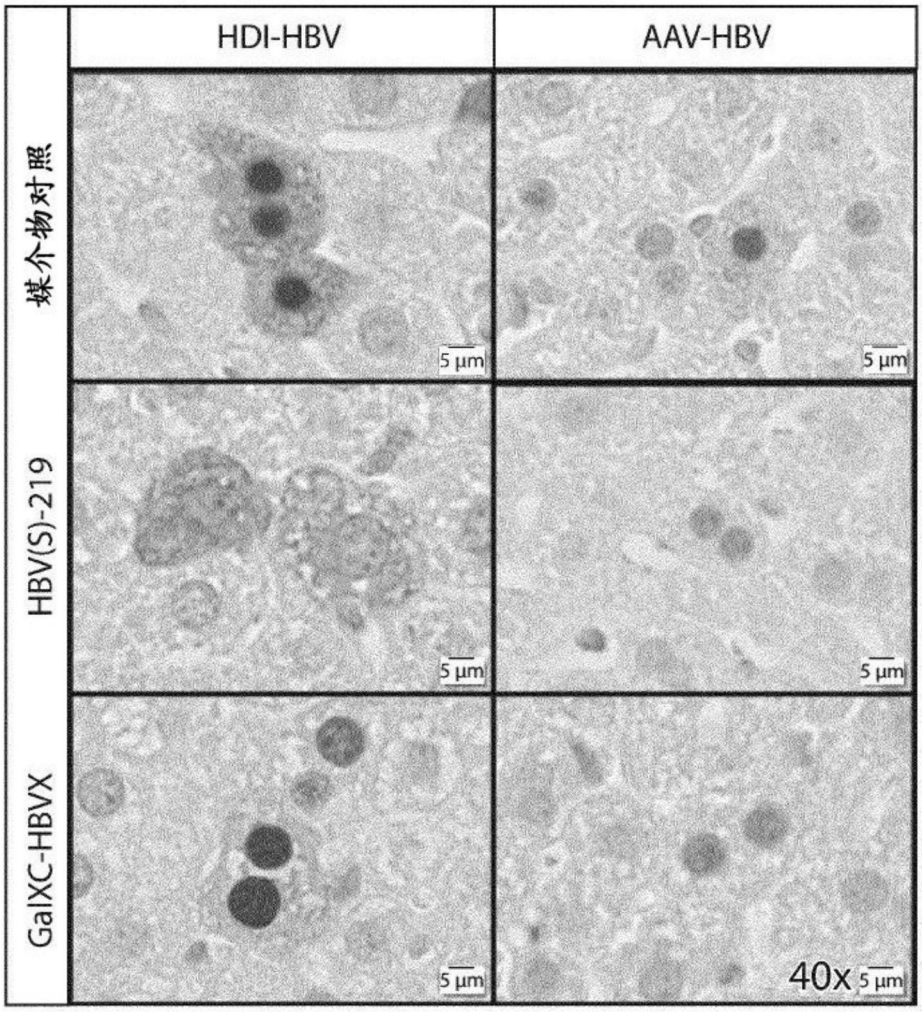


图23

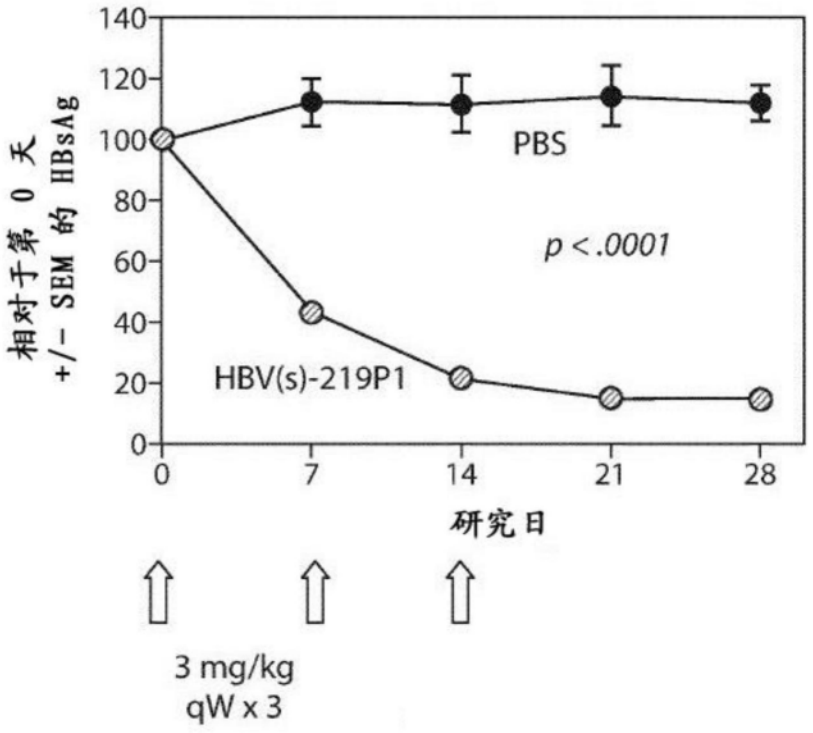

140
120
100
80
60
40
20
0
相对于第 0 天
+/- SEM 的 HBsAg
PBS
p < .0001
HBV(s)-219P1
0
7
14
21
28
研究日
3 mg/kg
qW x 3

图24A

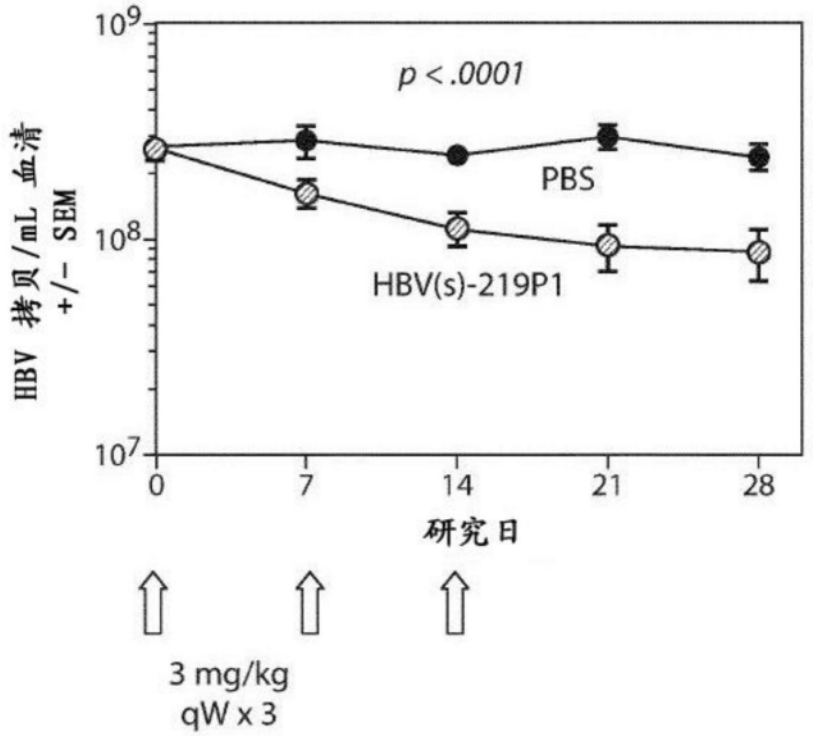

10^9
10^8
10^7
HBV 拷贝/mL 血清
+/- SEM
p < .0001
PBS
HBV(s)-219P1
0
7
14
21
28
研究日
3 mg/kg
qW x 3

图24B

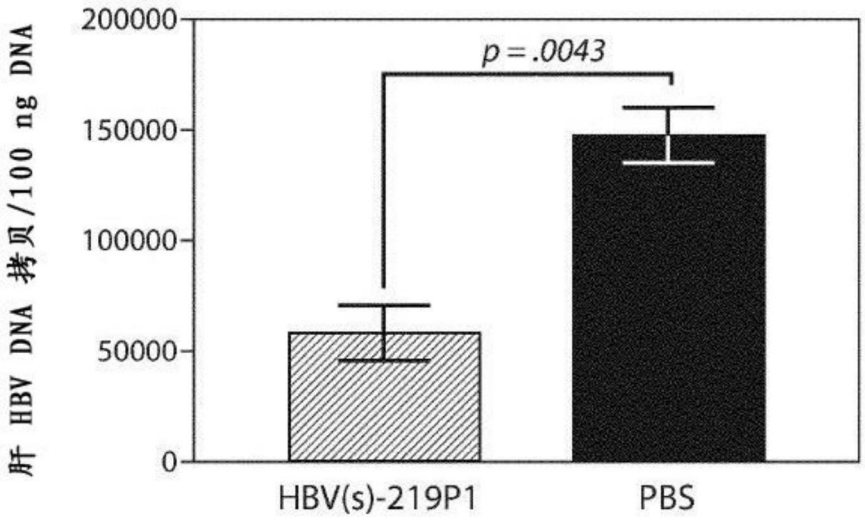

肝 HBV DNA 拷贝/100 ng DNA
200000
150000
100000
50000
0
p = .0043
HBV(s)-219P1
PBS

图24C

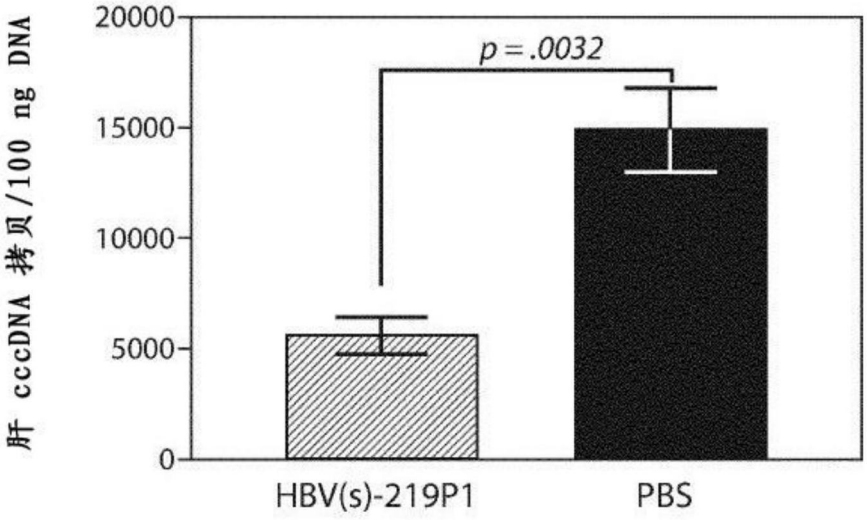

肝 cccDNA 拷贝/100 ng DNA
20000
15000
10000
5000
0
p = .0032
HBV(s)-219P1
PBS

图24D

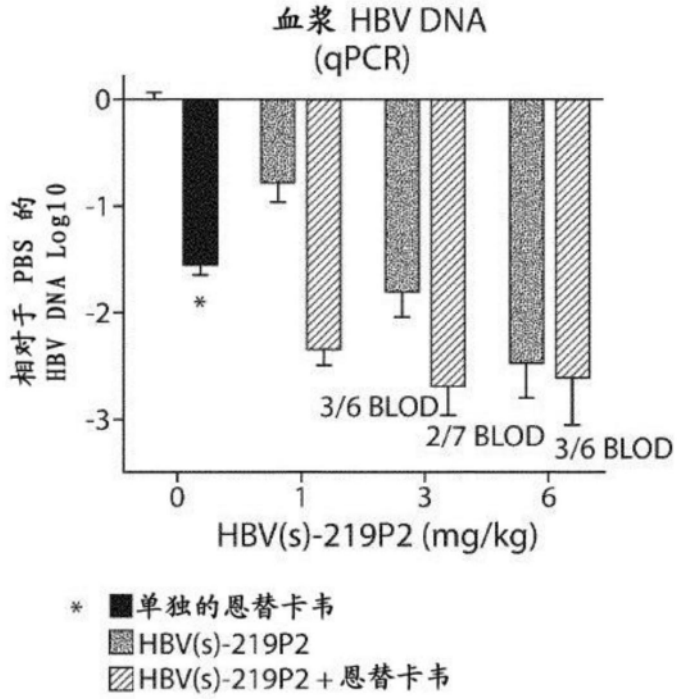

血浆 HBV DNA
(qPCR)
相对于 PBS 的
HBV DNA Log10
0
-1
-2
-3
*
3/6 BLOD
2/7 BLOD
3/6 BLOD
0
1
3
6
HBV(s)-219P2 (mg/kg)
* 单独的恩替卡韦
HBV(s)-219P2
HBV(s)-219P2 + 恩替卡韦

图25A

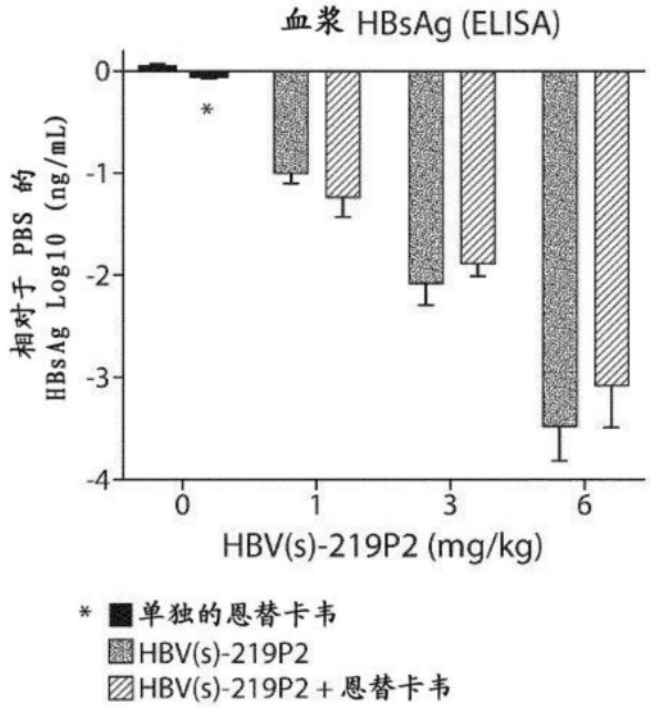

血浆 HBsAg (ELISA)
相对于 PBS 的
HBsAg Log10 (ng/mL)
0
-1
-2
-3
-4
*
0
1
3
6
HBV(s)-219P2 (mg/kg)
* 单独的恩替卡韦
HBV(s)-219P2
HBV(s)-219P2 + 恩替卡韦

图25B

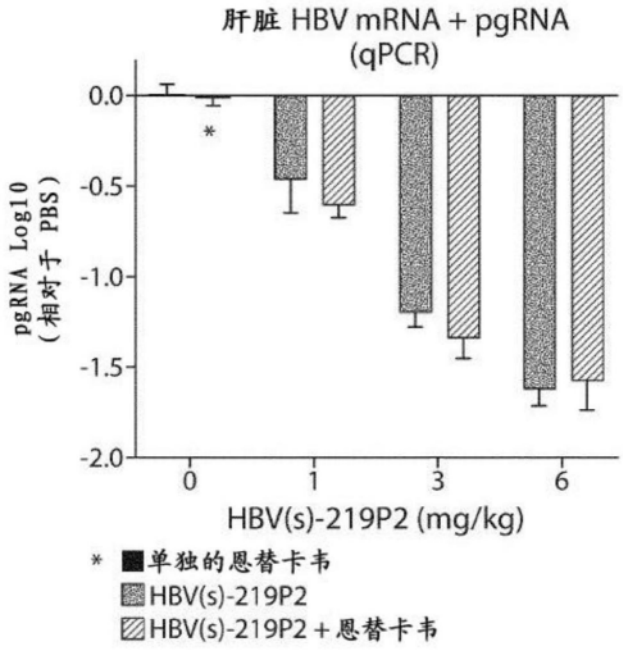

肝脏 HBV mRNA + pgRNA
(qPCR)
pgRNA Log10
(相对于 PBS)
0.0
-0.5
-1.0
-1.5
-2.0
*
0
1
3
6
HBV(s)-219P2 (mg/kg)
* 单独的恩替卡韦
HBV(s)-219P2
HBV(s)-219P2 + 恩替卡韦

图25C

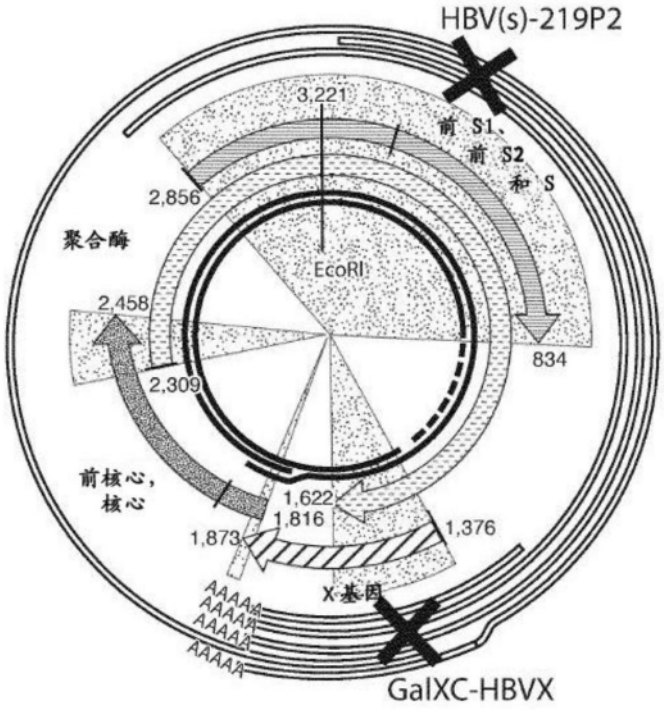

HBV(s)-219P2
3,221
前 S1、
前 S2
和 S
2,856
聚合酶
EcoRI
2,458
834
2,309
前核心,
核心
1,622
1,816
1,376
1,873
X 基因
AAAAA
AAAAA
AAAAA
AAAAA
GalXC-HBVX

图26A

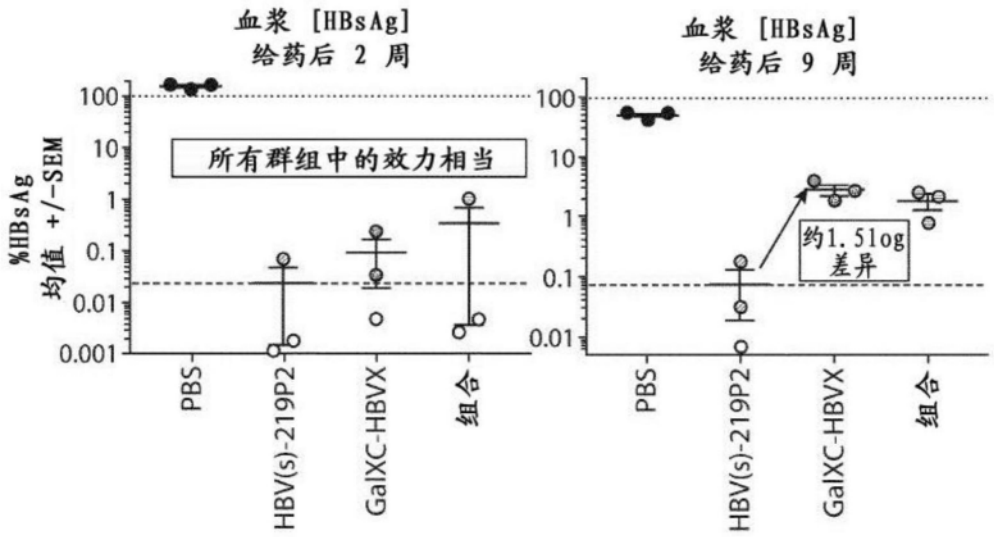

血浆 [HBsAg]
给药后 2 周
%HBsAg
均值 +/-SEM
100
10
1
0.1
0.01
0.001
所有群组中的效力相当
PBS
HBV(s)-219P2
GalXC-HBVX
组合
血浆 [HBsAg]
给药后 9 周
100
10
1
0.1
0.01
约1.51og
差异
PBS
HBV(s)-219P2
GalXC-HBVX
组合

图26B

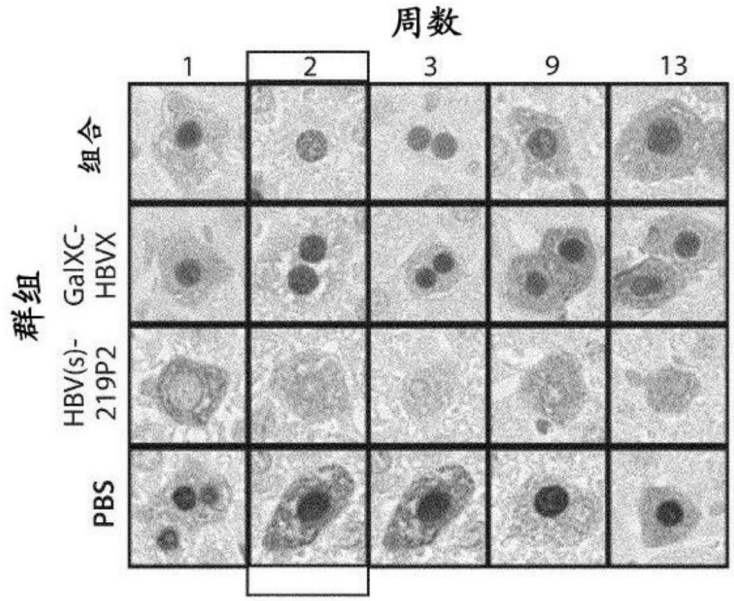

周数
1
2
3
9
13
群组
组合
GalXC-HBVX
HBV(s)-219P2
PBS

图27A

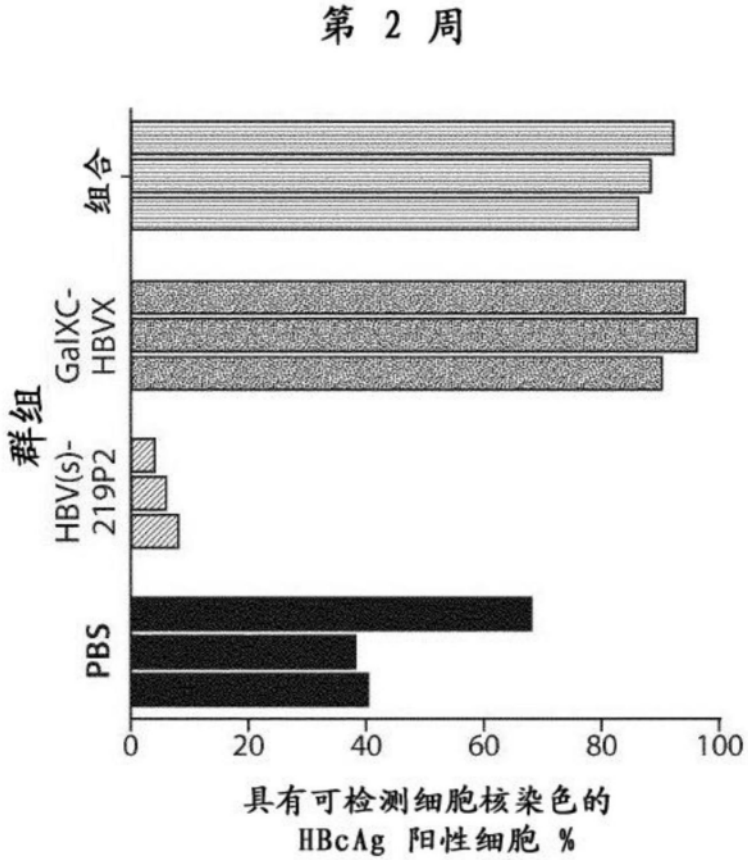

第 2 周
群组
组合
GalXC-HBVX
HBV(s)-219P2
PBS
0
20
40
60
80
100
具有可检测细胞核染色的
HBcAg 阳性细胞 %

图27B

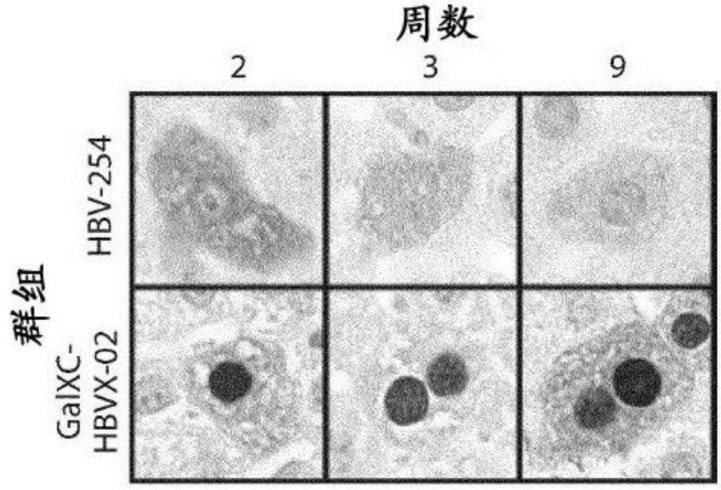

周数
2
3
9
群组
HBV-254
GalXC-HBVX-02

图27C

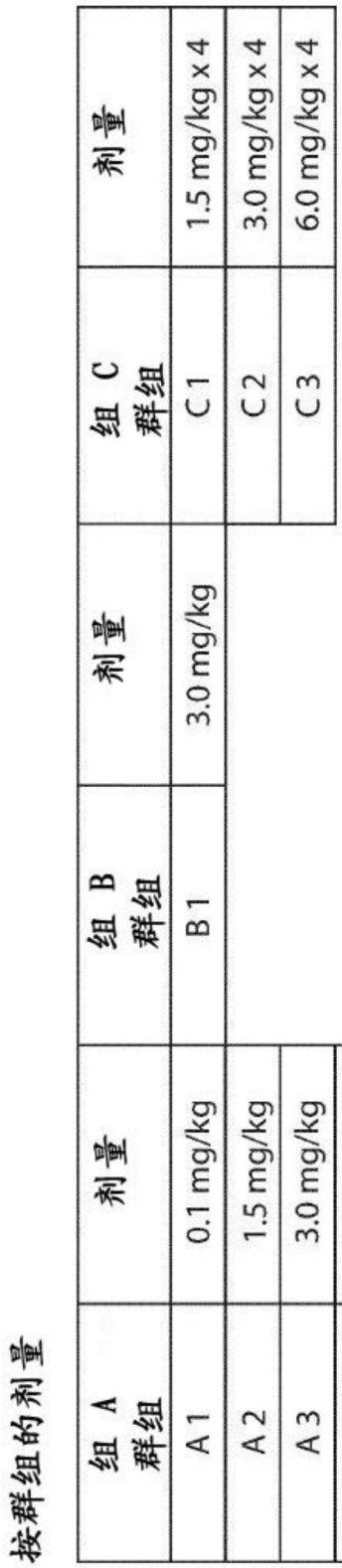

按群组的剂量
组 A 群组
剂量
A 1
0.1 mg/kg
A 2
1.5 mg/kg
A 3
3.0 mg/kg
A 4
6.0 mg/kg
A 5
12.0 mg/kg
组 B 群组
B 1
剂量
3.0 mg/kg
组 C 群组
剂量
C 1
1.5 mg/kg x 4
C 2
3.0 mg/kg x 4
C 3
6.0 mg/kg x 4

图28

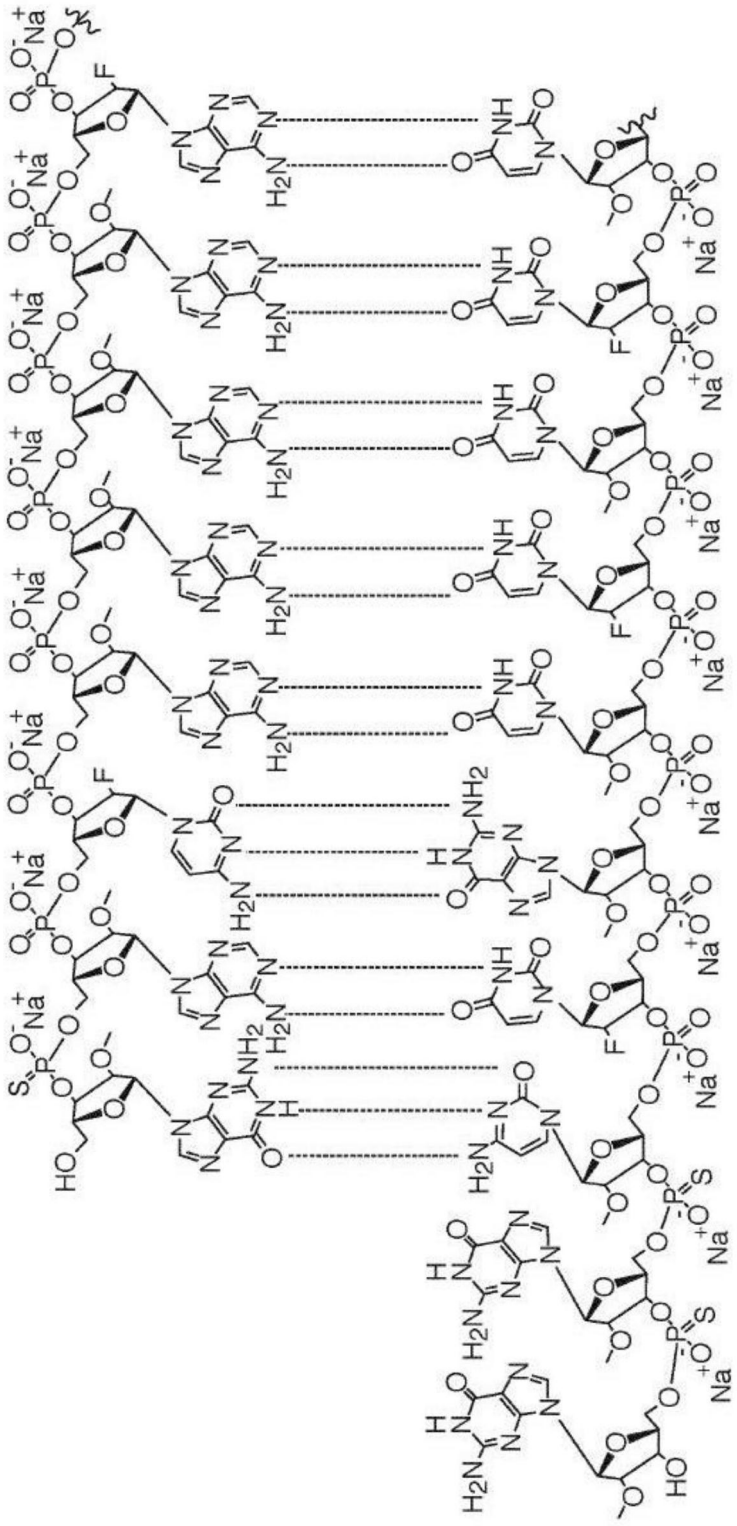


图29A

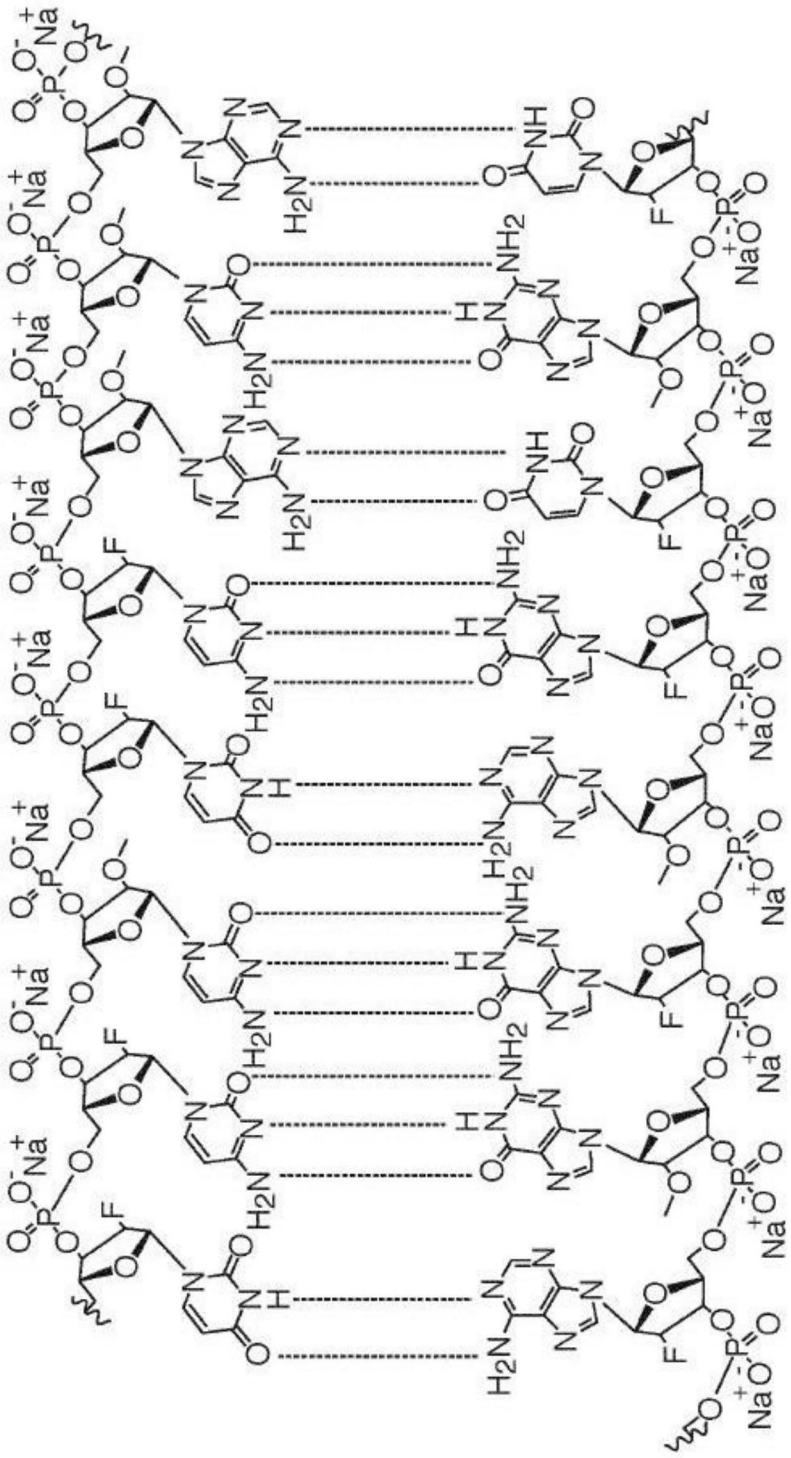


图29A(续)

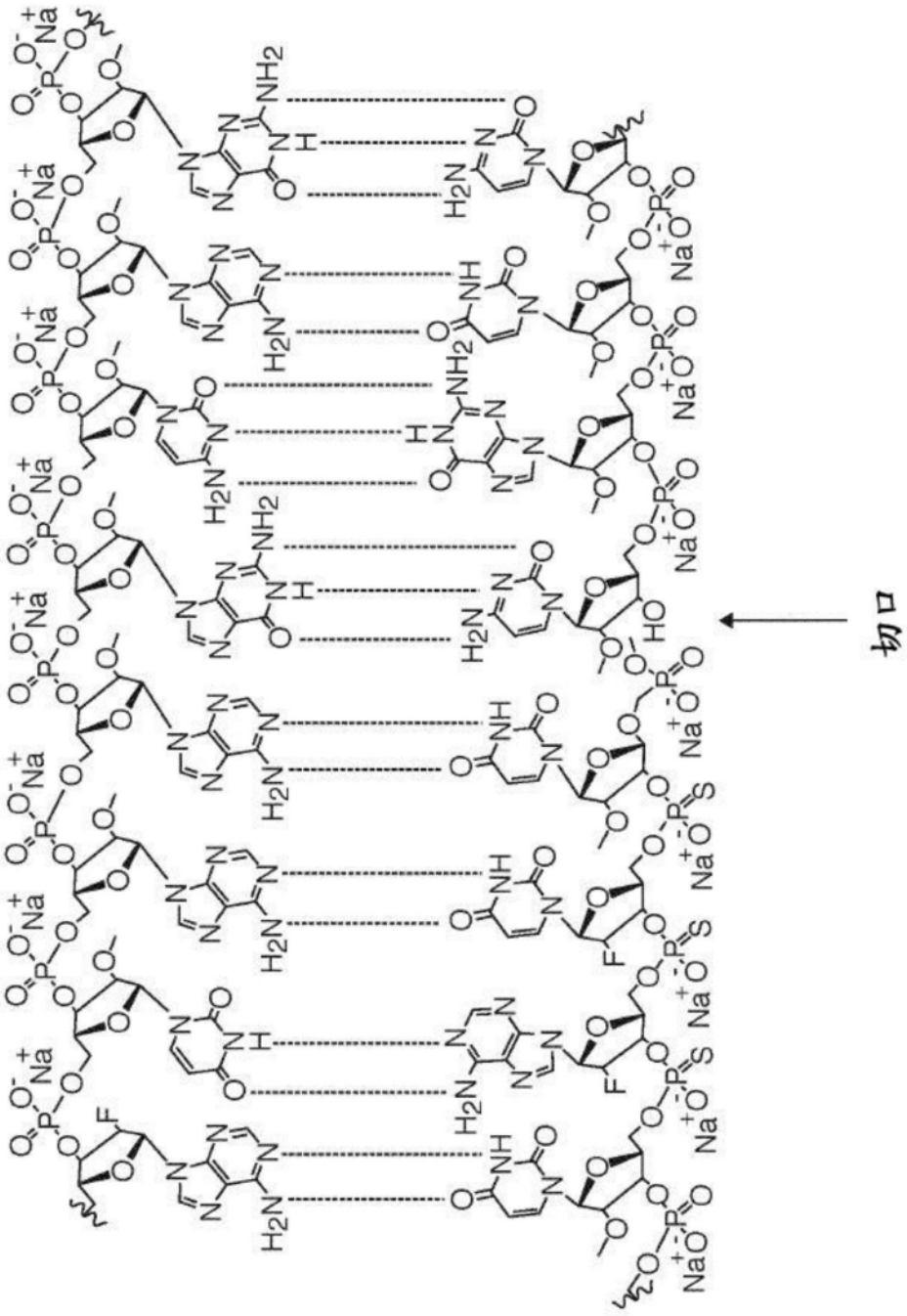


图29A(续)

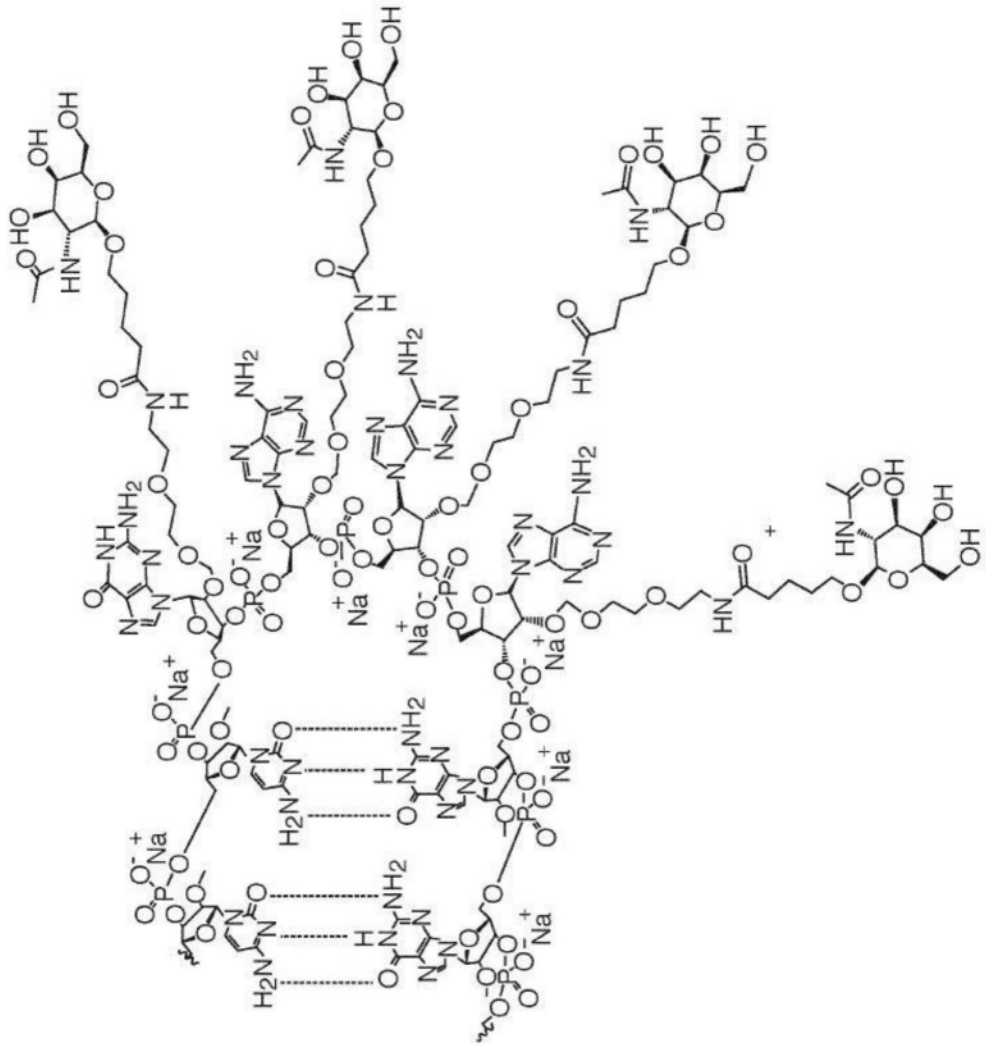


图29A(续)

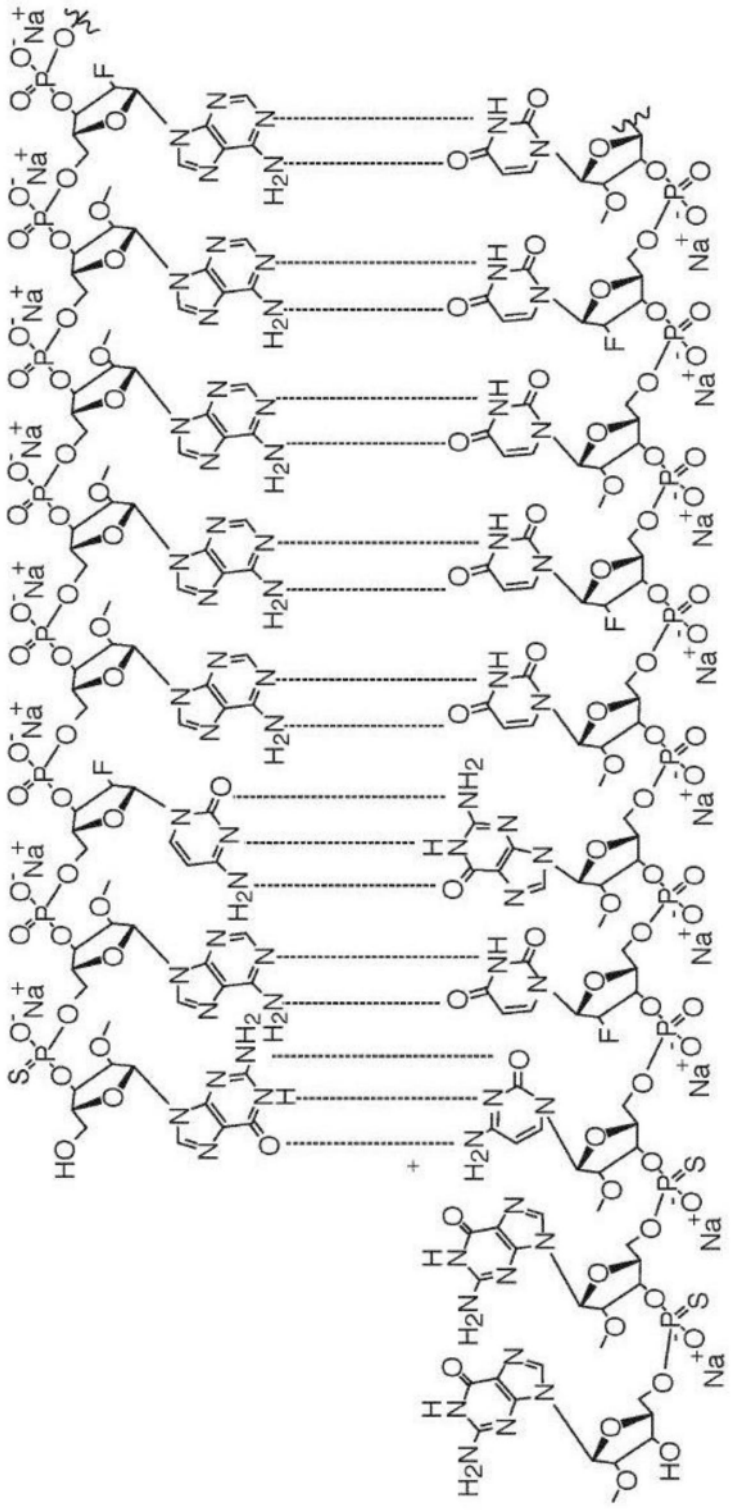


图29B

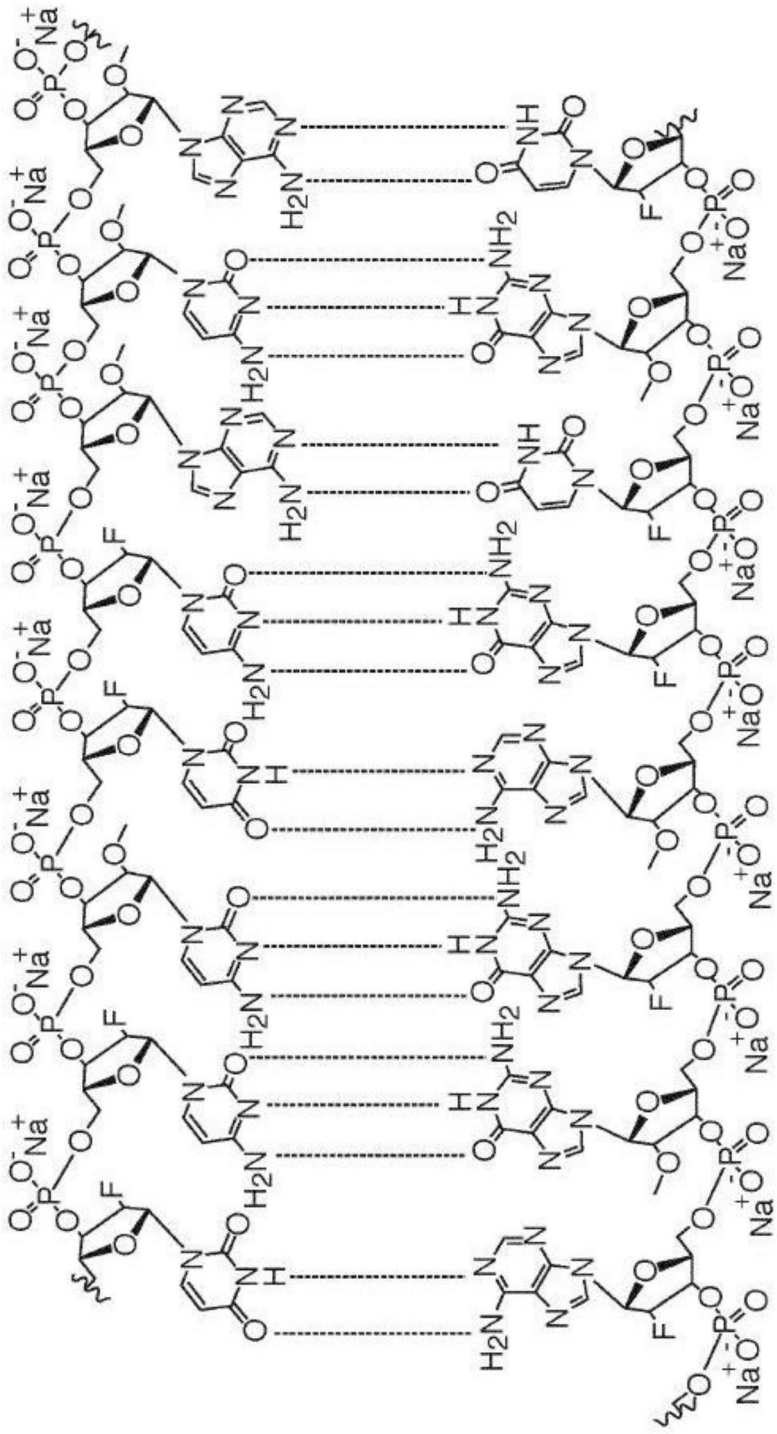


图29B(续)

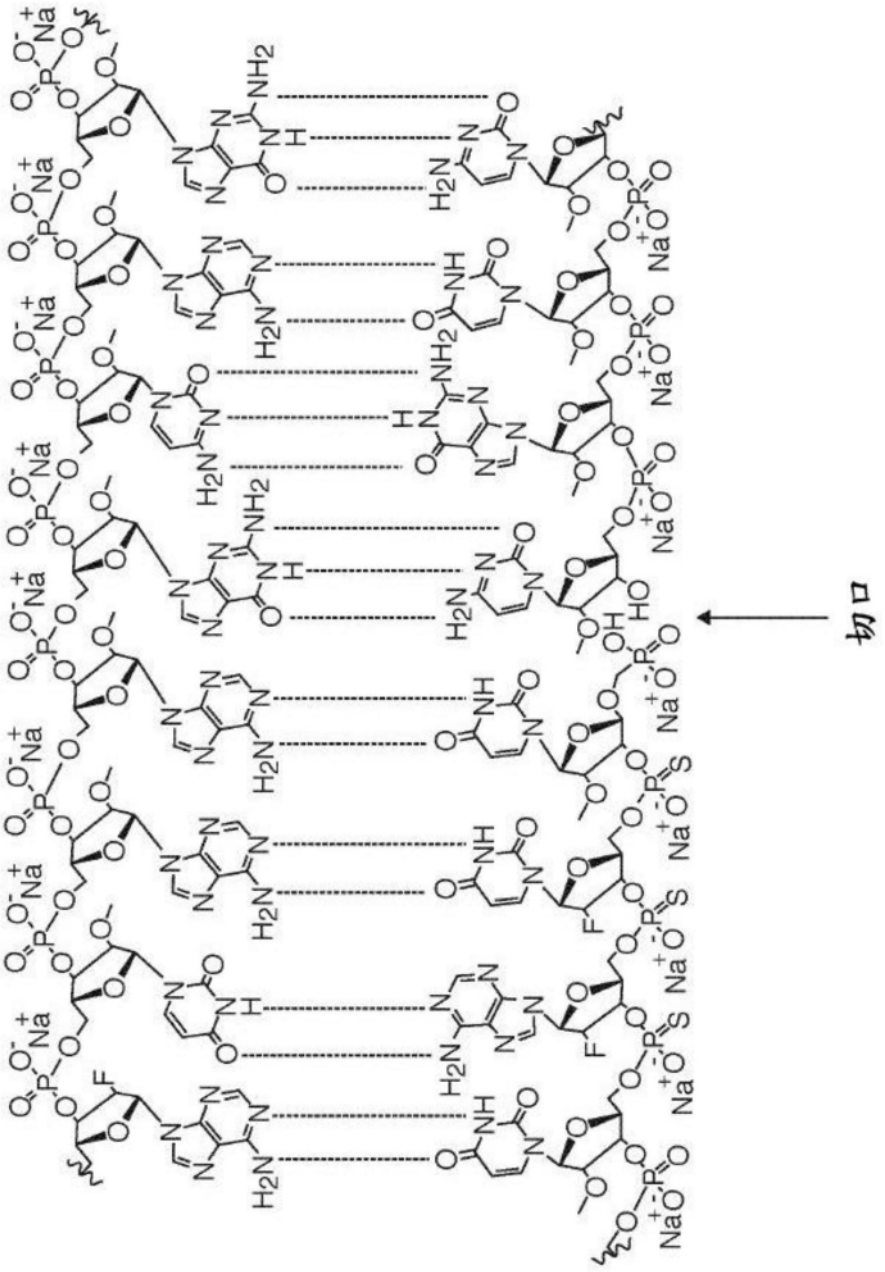


图29B(续)

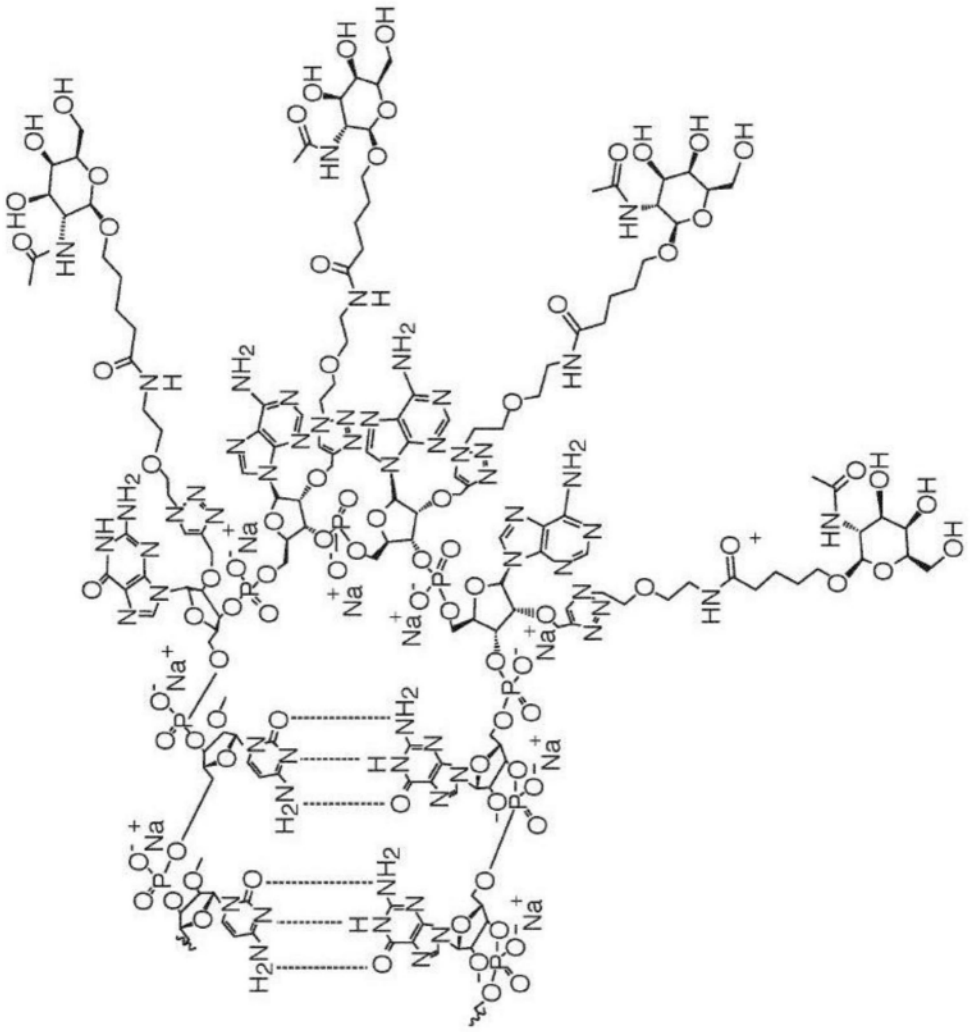


图29B(续)

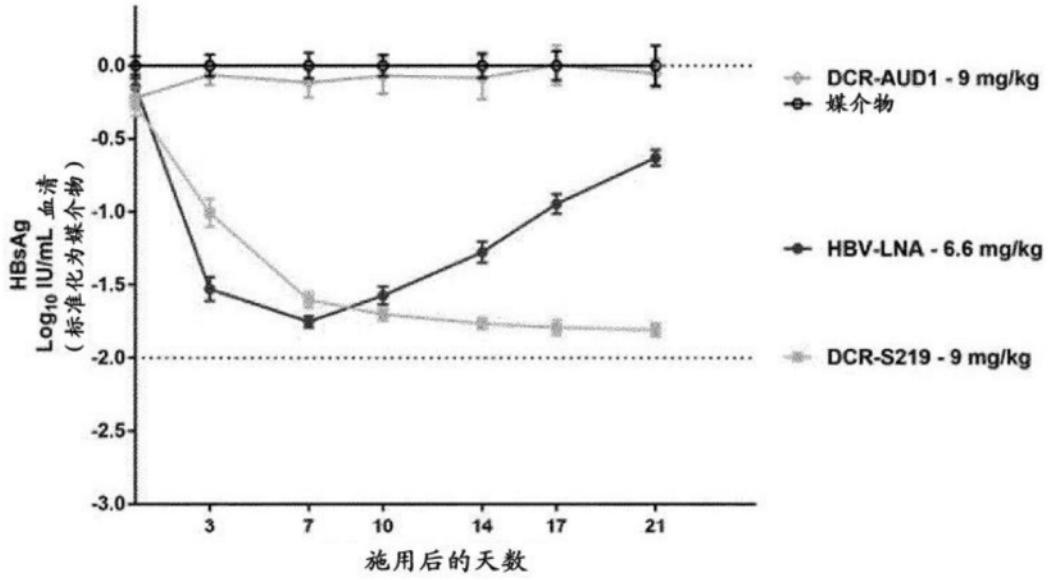

0.0
-0.5
-1.0
-1.5
-2.0
-2.5
-3.0
HBsAg
Log10 IU/mL 血清
（标准化为媒介物）
3
7
10
14
17
21
施用后的天数
DCR-AUD1 - 9 mg/kg
媒介物
HBV-LNA - 6.6 mg/kg
DCR-S219 - 9 mg/kg

图30