



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119032175 A

(43) 申请公布日 2024. 11. 26

(21) 申请号 202380034549.X

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所  
11256

(22) 申请日 2023.03.16

专利代理师 陈文平 袁泉

(30) 优先权数据

63/321,019 2022.03.17 US

(51) Int.Cl.

C12N 15/113 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 31/7115 (2006.01)

2024.10.16

A61K 31/712 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2023/015398 2023.03.16

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2023/177808 EN 2023.09.21

(71) 申请人 阿利戈斯治疗公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 L·贝格尔曼 V·K·拉杰万什

L·埃尔特普 S·M·蒙特罗

洪劲

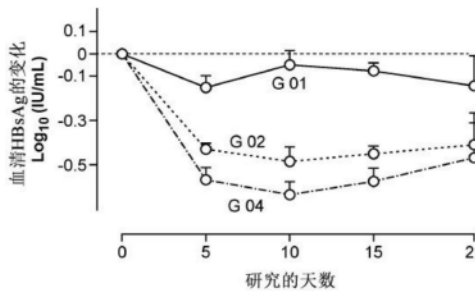
权利要求书8页 说明书56页 附图1页

(54) 发明名称

经修饰的间隔体寡聚物及其使用的方法

(57) 摘要

本公开包括反义寡核苷酸 (ASO), 包括间隔体ASO, 及其制备和使用的方法。

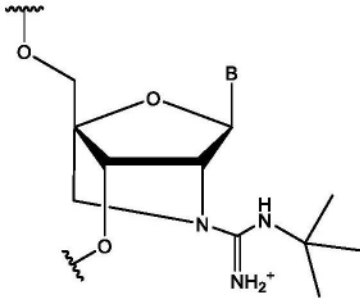


—○— G 01: 媒介物, 5 mL/kg, SC  
 - - ○ - - G 02: ASO 59, 5 mg/kg, SC, 0天一次GalNAc-LNA亲本  
 - - ○ - - G 04: ASO 84, 5 mg/kg, SC, 0天一次GalNAc-Nmln ASO

1. 一种反义寡核苷酸 (ASO), 其包含14-22个核苷酸单元, 以及:

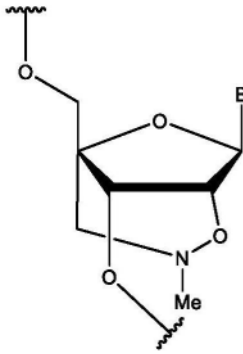
- (a) 包含6个或更多个连续的DNA核苷酸的中心区 (B');
- (b) 包含2至6个锁核苷酸或2'取代核苷的5'翼区 (A'); 和
- (c) 包含2至6个锁核苷酸或2'取代核苷的3'翼区 (C');

其中所述ASO的所述中心区与靶RNA序列至少80%互补或者杂交; 并且其中所述ASO包含选自以下的至少一个经修饰的核苷酸:



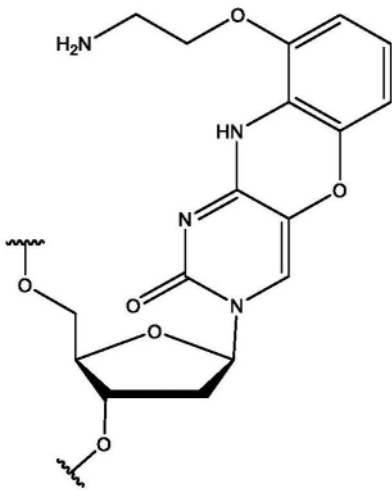
其中B为核碱基,

(N-叔丁基-胍(Gutb)),



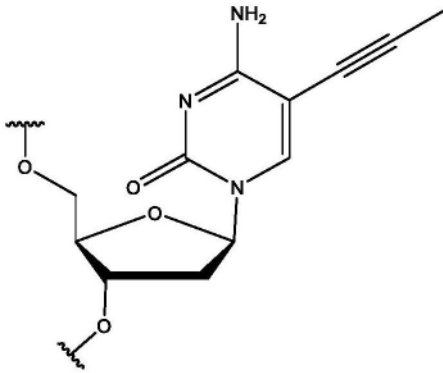
其中B为核碱基,

(N 甲基-LNA (Nmln)),



和

(G-夹),



(5(Me)-丙炔基(5prnl))。

2. 根据权利要求1所述的ASO,其中(i)所述中心区(B')包含选自G-夹和5prnl的经修饰的核苷酸,(ii)所述5'翼区(A')包含选自Gutb和Nmln的经修饰的核苷酸,(iii)所述3'翼区(C')包含选自Gutb和Nmln的经修饰的核苷酸,或者(iv)它们的任何组合。

3. 根据权利要求1或2所述的ASO,其中所述中心区(B')包含2、3、4、5或6个或更多个经修饰的核苷酸。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的ASO,其中所述5'翼区(A')、所述3'翼区(C')或两者包含选自Gutb、Nmln、G-夹和5prnl的经修饰的核苷酸。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的ASO分子,其中所述ASO分子进一步包含1个或多个硫代磷酸酯(ps)核苷间键、甲磺酰基磷酰胺酯(yp)核苷间键或它们的组合。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的ASO分子,其中所述ASO分子进一步包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21或22个硫代磷酸酯(ps)核苷间键、甲磺酰基磷酰胺酯(yp)核苷间键或它们的组合。

7. 一种反义寡核苷酸(ASO),其包含14-22个核苷酸单元,其中所述ASO包含:

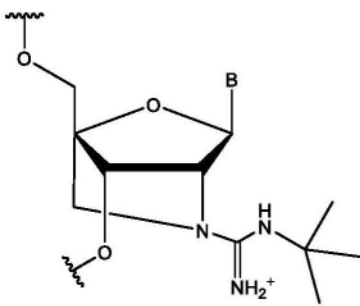
(a) 包含6个或更多个连续的DNA核苷酸的中心区(B'),其中所述连续的DNA核苷酸中的至少一个为经修饰的核苷酸,

(b) 包含2至6个锁核苷酸或2'取代核苷的5'翼区(A'),和

(c) 包含2至6个锁核苷酸或2'取代核苷的3'翼区(C'),

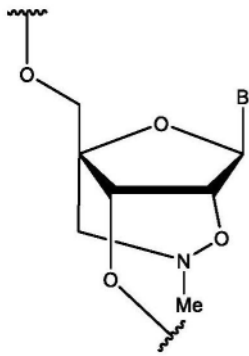
其中所述ASO的所述中心区与靶RNA序列至少80%互补或者杂交,并且其中所述ASO包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15个或更多个甲磺酰基磷酰胺酯(yp)核苷间键。

8. 根据权利要求7所述的ASO,其中所述ASO包含选自以下的至少1个、至少2个、至少3个、至少4个或至少5个或更多个核苷酸:



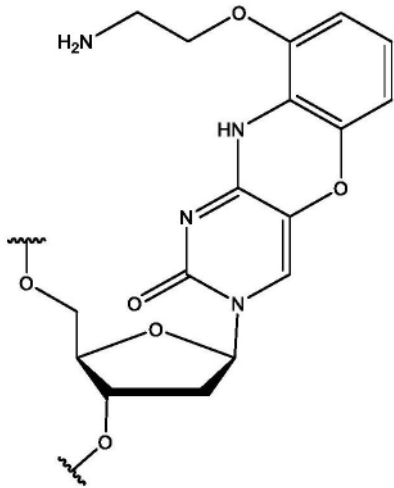
(N-叔丁基-胍(Gutb)),

其中B为核碱基,



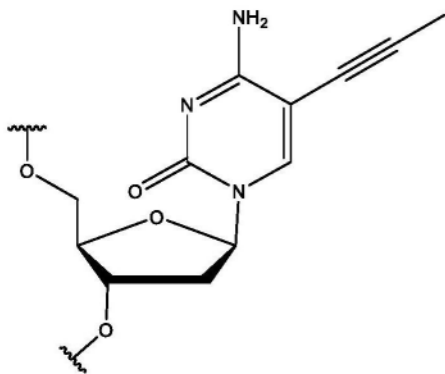
(N 甲基-LNA (Nmln)),

其中B为核碱基,



(G-夹),

和



(5(Me)-丙炔基(5prnl))。

9. 根据权利要求7或8所述的ASO分子,其中所述ASO分子进一步包含1个或多个硫代磷酸酯(ps)核苷间键。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的ASO分子,其中:

- (i) 至少一个甲磺酰基磷酰胺酯(yp)核苷酸间键位于从所述ASO分子的所述5'端起的核苷位置3与4之间;
- (ii) 至少一个甲磺酰基磷酰胺酯(yp)核苷酸间键位于从所述ASO分子的所述5'端起的核苷位置5与6之间;
- (iii) 至少一个甲磺酰基磷酰胺酯(yp)核苷酸间键位于从所述ASO分子的所述5'端起的核苷位置6与7之间;
- (iv) 至少一个甲磺酰基磷酰胺酯(yp)核苷酸间键位于从所述ASO分子的所述5'端起的核苷位置7与8之间;
- (v) 至少一个甲磺酰基磷酰胺酯(yp)核苷酸间键位于从所述ASO分子的所述5'端起的

核苷位置8与9之间;

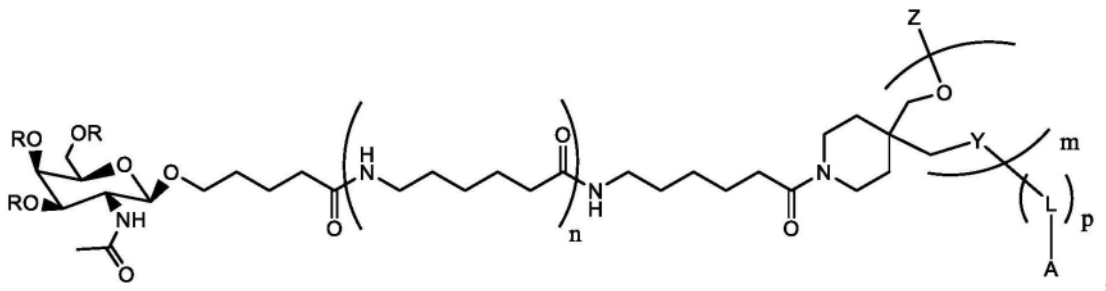
(vi) 至少一个甲磺酰基磷酸胺酯 (yp) 核苷酸间键位于从所述ASO分子的所述5'端起的核苷位置9与10之间;或者

(vii) 它们的组合。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的ASO, 其中所述5'翼区(A')、所述3'翼区(C')或两者包含至少一个甲磺酰基磷酸胺酯 (yp) 核苷酸间键。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的ASO分子, 其中所述ASO分子进一步包含半乳糖胺。

13. 根据权利要求12所述的ASO分子, 其中所述半乳糖胺为式(VI)的N-乙酰半乳糖胺(GalNAc):



其中

m为1、2、3、4或5;

每个n独立地为1或2;

p为0或1;

每个R独立地为H;

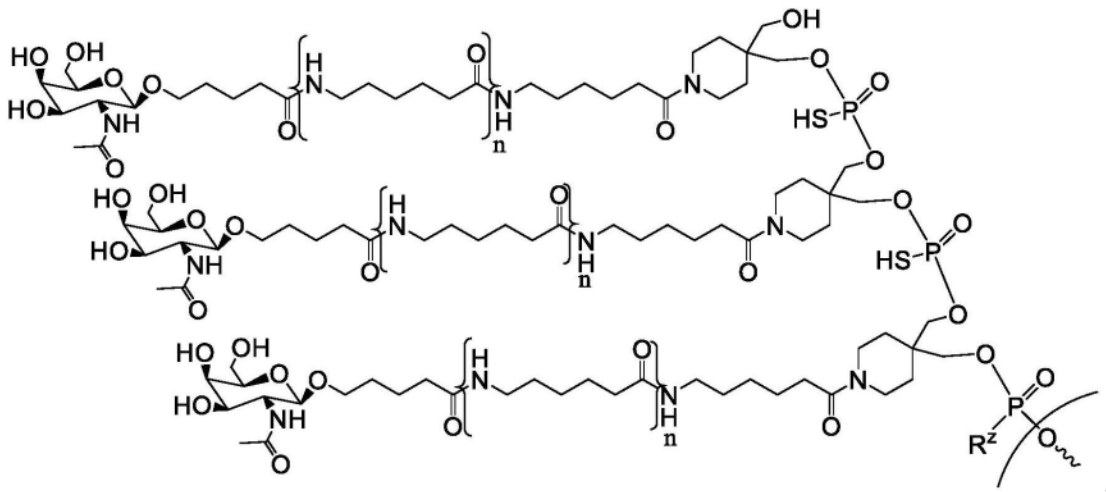
每个Y独立地选自-O-P(=O)(SH)-、-O-P(=O)(O)-、-O-P(=O)(OH)-和-O-P(S)S-;

Z为H或第二保护基团;

L为接头或者L和Y组合地为接头;并且

A为H、OH、第三保护基团、活化基团或寡核苷酸。

14. 根据权利要求12所述的ASO分子, 其中所述半乳糖胺为式(VII)的N-乙酰半乳糖胺(GalNAc):



其中R<sup>2</sup>为OH或SH;并且每个n独立地为1或2。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的ASO分子,其中;

(i) 所述靶RNA序列为病毒基因;

(ii) 所述靶RNA序列为来自DNA病毒的基因;

(iii) 所述靶RNA序列为来自双链DNA (dsDNA) 病毒的基因;

(iv) 所述靶RNA序列为来自嗜肝DNA病毒的基因;

(v) 所述靶RNA序列为来自乙型肝炎病毒 (HBV) 的基因;

(vi) 所述靶RNA序列为来自基因型A-J中的任一种的HBV的基因;或者

(vii) 所述靶RNA序列选自HBV的S基因或X基因。

16. 根据权利要求1至14中任一项所述的ASO分子,其中所述靶RNA序列选自编码甲基化控制的J蛋白 (MCJ蛋白) 的基因、编码TAZ的基因、编码血管生成素样3 (ANGPTL3) 的基因、编码二酰基甘油酰基转移酶2 (DGAT2) 的基因和编码羟基类固醇17-β脱氢酶13 (HSD17B13) 的基因。

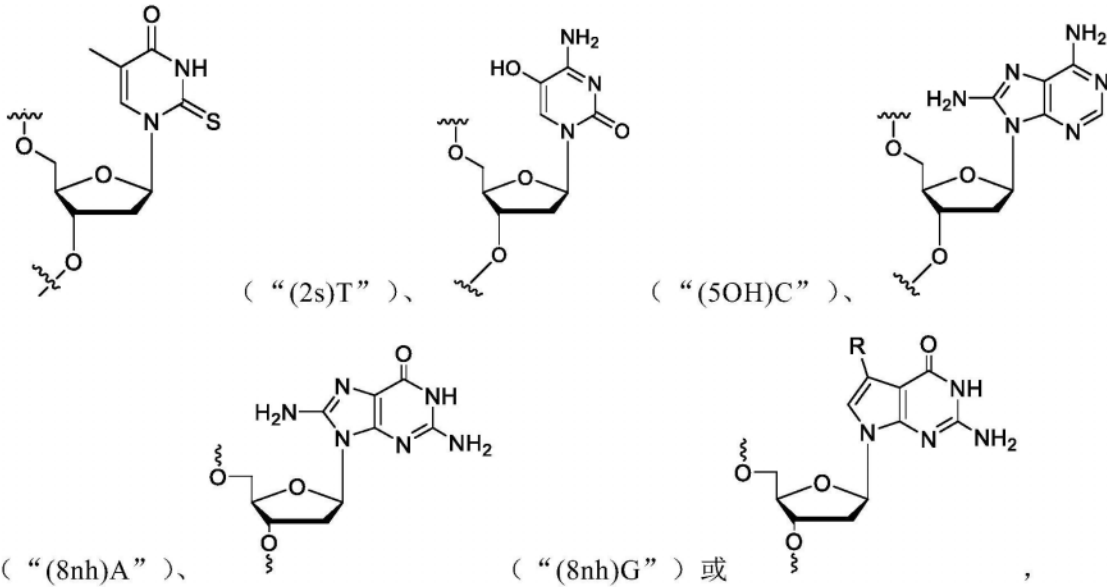
17. 根据权利要求1至16中任一项所述的ASO分子,其中 (i) 所述ASO的所述5'翼区包含2至6个硫代磷酸酯连接的锁核苷, (ii) 所述ASO的所述3'翼区包含2至6个硫代磷酸酯连接的锁核苷,或者 (iii) 它们的组合。

18. 根据权利要求17所述的ASO,其中所述锁核苷选自LNA、ScpBNA、AmNA、AmNA (N-Me)、GuNA、GuNA (N-R<sup>11</sup>), 其中R<sup>11</sup>选自Me、Et、i-Pr、t-Bu和它们的组合。

19. 根据权利要求1至18中任一项所述的ASO分子,其中所述ASO的所述中心区包含至少5个连续的硫代磷酸酯连接的DNA核苷酸、至少5个连续的甲磺酰基磷酰胺酯连接的DNA核苷酸、或至少5个通过一个或多个硫代磷酸酯核苷间键和一个或多个甲磺酰基磷酰胺酯核苷间键连接的连续的DNA核苷酸。

20. 根据权利要求5至19中任一项所述的ASO分子,其中所述ASO的所述中心区包含8至10个连续的硫代磷酸酯连接的DNA核苷酸、8至10个连续的甲磺酰基磷酰胺酯连接的DNA核苷酸、或8至10个通过一个或多个硫代磷酸酯核苷间键和一个或多个甲磺酰基磷酰胺酯核苷间键连接的DNA核苷酸。

21. 根据权利要求1至20中任一项所述的ASO,其中所述ASO包含至少一个具有以下结构的经修饰的核苷酸:

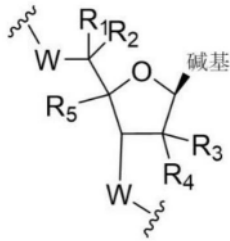


其中：

R为卤素或R'-C≡C-；并且

R'为C<sub>6-12</sub>芳基、5元至12元杂芳基、羟基-C<sub>1-6</sub>烷基或C<sub>1-7</sub>烷酰基氧基。

22. 根据权利要求1至21中任一项所述的ASO，其中所述ASO包含至少一个具有以下结构的经修饰的核苷酸：



其中：

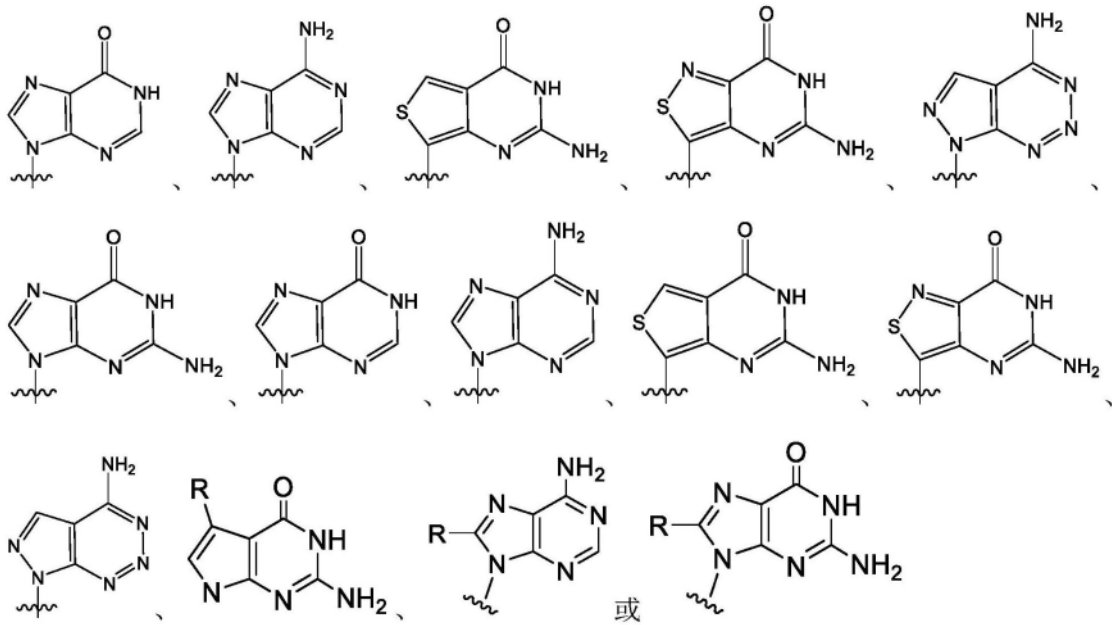
W独立地为O、N或S；

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>和R<sub>5</sub>独立地为H或D；

R<sub>3</sub>为H或F；

R<sub>4</sub>为F或OCH<sub>3</sub>；并且

碱基为



其中:

R为卤素或R'-C≡C-;并且

R'代表C<sub>6-12</sub>芳基、5元至12元杂芳基、羟基C<sub>1-6</sub>烷基或C<sub>1-7</sub>烷酰基氧基。

23. 一种ASO分子,其如表1中所示。

24. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1至23中任一项所述的ASO分子;以及药学上可接受的赋形剂。

25. 根据权利要求24所述的药物组合物,其进一步包含2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个根据权利要求3至22中任一项所述的ASO分子。

26. 根据权利要求24或25所述的药物组合物,其进一步包含额外治疗剂。

27. 根据权利要求26所述的药物组合物,其中所述额外治疗剂选自核苷酸类似物、核苷类似物、衣壳组装调节剂(CAM)、重组干扰素、进入抑制剂、小分子免疫调节剂和寡核苷酸疗法,其中所述寡核苷酸疗法任选地选自额外反义寡核苷酸(ASO)、短干扰核酸(siNA)、NAP或STOPS™。

28. 一种治疗患有乙型肝炎病毒(HBV)感染的受试者的方法,所述方法包括向患有HBV的所述受试者施用根据权利要求1至23中任一项所述的ASO或根据权利要求24至27中任一项所述的药物组合物。

29. 根据权利要求28所述的方法,其进一步包括施用额外治疗剂。

30. 根据权利要求29所述的方法,其中所述额外治疗剂选自核苷酸类似物、核苷类似物、衣壳组装调节剂(CAM)、重组干扰素、进入抑制剂、小分子免疫调节剂和寡核苷酸疗法,其中所述寡核苷酸疗法任选地选自额外反义寡核苷酸(ASO)、短干扰核酸(siNA)、NAP或STOPS™。

31. 根据权利要求28所述的方法,其中所述额外治疗剂选自自由包括以下项组成的组: ALG-010133、ALG-000184、重组干扰素α2b、IFN-a、PEG-IFN-a-2a、拉米夫定、替比夫定、阿德福韦酯、克拉夫定、恩替卡韦、替诺福韦艾拉酚胺、替诺福韦二吡呋酯、NVR3-778、BAY41-4109、JNJ-632、JNJ-3989(ARO-HBV)、RG6004、GSK3228836、REP-2139、REP-2165、AB-729、VIR-2218、DCR-HBVS、JNJ-6379、GLS4、ABI-H0731、JNJ-440、NZ-4、RG7907、EDP-514、AB-423、

AB-506、ABI-H03733和ABI-H2158。

32. 根据权利要求28至31中任一项所述的方法,其中所述AS0和所述额外治疗剂同时地或相继地施用。

33. 根据权利要求28至32中任一项所述的方法,其中所述治疗包括降低所述受试者中HBV的病毒载量、降低所述受试者中病毒抗原的水平或它们的组合。

34. 一种降低受试者中靶基因的表达的方法,所述方法包括向所述受试者施用根据权利要求1至23中任一项所述的AS0或根据权利要求24至27中任一项所述的药物组合物。

35. 根据权利要求34所述的方法,其中所述靶基因对于所述受试者是内源性的基因或者所述靶基因对于所述受试者不是内源性的。

36. 根据权利要求34或35所述的方法,其中所述受试者患有选自乙型肝炎病毒(HBV)、冠状病毒感染和肝病的疾病,其中所述肝病任性地选自非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)和肝细胞癌(HCC)。

37. 根据权利要求28至36中任一项所述的方法,其中所述受试者为哺乳动物,任性地为成年人。

38. 根据权利要求28至37中任一项所述的方法,其中所述AS0以至少1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg、10mg/kg、11mg/kg、12mg/kg、13mg/kg、14mg/kg或15mg/kg的剂量施用。

39. 根据权利要求28至38中任一项所述的方法,其中所述AS0以0.5mg/kg至50mg/kg、0.5mg/kg至40mg/kg、0.5mg/kg至30mg/kg、1mg/kg至50mg/kg、1mg/kg至40mg/kg、1mg/kg至30mg/kg、1mg/kg至20mg/kg、3mg/kg至50mg/kg、3mg/kg至40mg/kg、3mg/kg至30mg/kg、3mg/kg至20mg/kg、3mg/kg至15mg/kg、3mg/kg至10mg/kg、4mg/kg至50mg/kg、4mg/kg至40mg/kg、4mg/kg至30mg/kg、4mg/kg至20mg/kg、4mg/kg至15mg/kg、4mg/kg至10mg/kg、5mg/kg至50mg/kg、5mg/kg至40mg/kg、5mg/kg至30mg/kg、5mg/kg至20mg/kg、5mg/kg至15mg/kg或5mg/kg至10mg/kg之间的剂量施用。

40. 根据权利要求28至39中任一项所述的方法,其中至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10次施用所述AS0。

41. 根据权利要求28至40中任一项所述的方法,其中一天至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10次,一周至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10次,或者一个月至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10次施用所述AS0。

42. 根据权利要求28至41中任一项所述的方法,其中每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21天至少一次施用所述AS0。

43. 根据权利要求28至42中任一项所述的方法,其中持续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21天,或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、51、52、53、54或55周的时间段施用所述AS0。

## 经修饰的间隔体寡聚物及其使用的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据35 U.S.C. §119要求2022年3月17日提交的临时申请序列号63/321,019的优先权,其公开以引用方式并入本文。

### 背景技术

[0003] 提供了以下讨论以帮助读者理解本公开,并且以下讨论不承认描述或构成其现有技术。

[0004] 全球约有3亿人慢性感染HBV。HBsAg消失是“功能性治愈”的一个关键方面,是许多新疗法的目标。反义寡核苷酸已经被证明是在动物模型中降低HBsAg的有效方式,并且这些分子的临床研究正在进行中。

[0005] 然而,用反义寡核苷酸治疗HBV仍然存在例如核酸酶降解和肝毒性等问题。因此,本领域需要发现对核酸酶降解具有更大抗性和改善肝脏安全性特性的反义寡核苷酸。

### 发明内容

[0006] 本公开涉及含有寡核苷酸的化合物和组合物以及它们在预防或治疗疾病和病症例如乙型肝炎 (HBV) 中的用途。

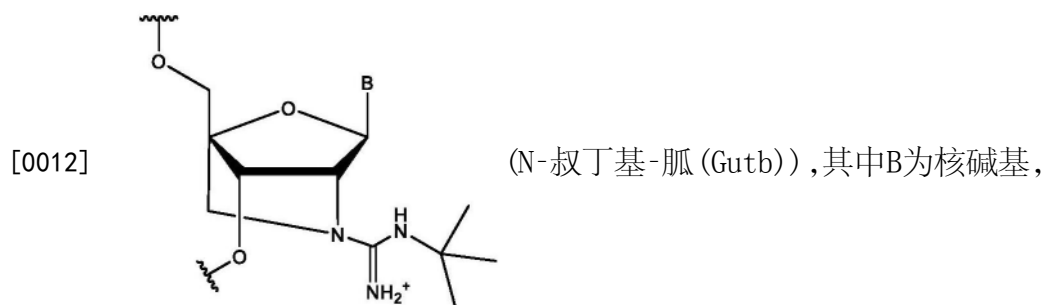
[0007] 在一方面,本公开提供了一种反义寡核苷酸 (ASO), 其包含14-22个核苷酸单元,以及:

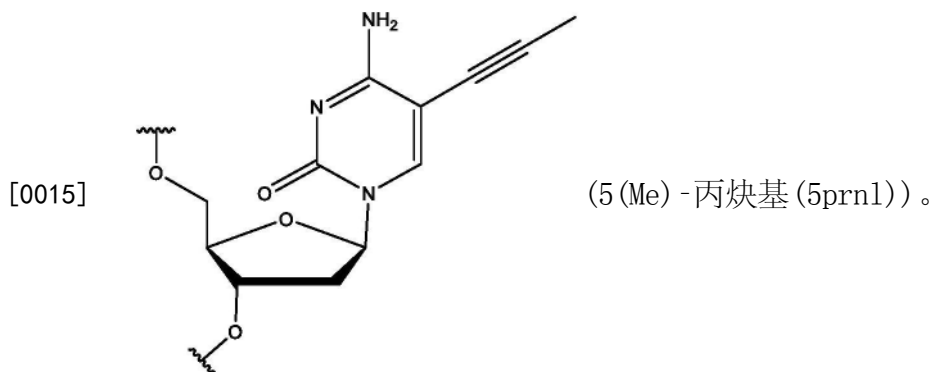
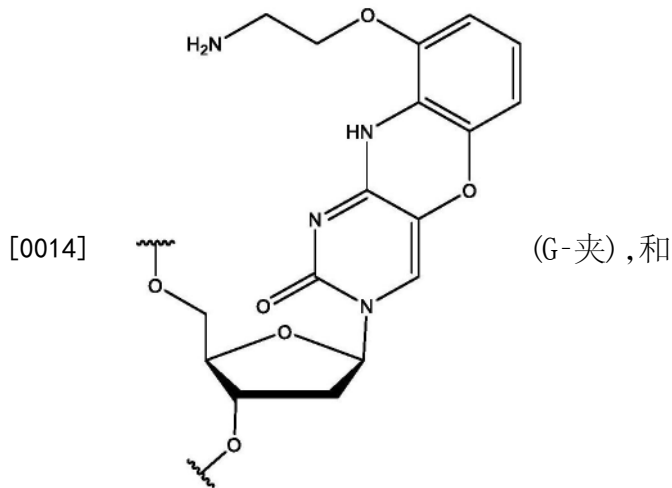
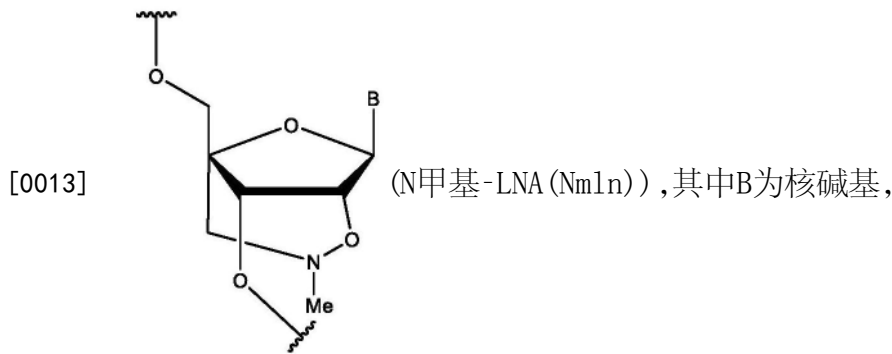
[0008] (a) 包含6个或更多个连续的DNA核苷酸的中心区 (B');

[0009] (b) 包含2至6个锁核苷酸或2'取代核苷的5'翼区 (A');和

[0010] (c) 包含2至6个锁核苷酸或2'取代核苷的3'翼区 (C');

[0011] 其中ASO的中心区与靶RNA序列至少80%互补或者杂交;并且其中ASO包含选自以下的至少一个经修饰的核苷酸:





[0016] 在另一方面,本公开提供了反义寡核苷酸(ASO),其包含14-22个核苷酸单元,以及:(a)包含6个或更多个连续的DNA核苷酸的中心区(B'),其中该连续的DNA核苷酸中的至少一个为选自Gutb、Nm1n、G-夹和5prn1的经修饰的核苷酸;

[0017] (b)包含2至6个锁核苷酸或2'取代核苷的5'翼区(A');和

[0018] (c)包含2至6个锁核苷酸或2'取代核苷的3'翼区(C');

[0019] 其中ASO的中心区与靶RNA序列至少80%互补或者杂交。

[0020] 在另一方面,本公开提供了反义寡核苷酸(ASO),其包含14-22个核苷酸单元,以及:(a)包含6个或更多个连续的DNA核苷酸的中心区(B');(b)包含2至6个锁核苷酸或2'取代核苷的5'翼区(A');和(c)包含2至6个锁核苷酸或2'取代核苷的3'翼区(C');其中ASO的中心区与靶RNA序列至少80%互补或者杂交;并且其中(i)中心区(B')包含选自G-夹和5prn1的经修饰的核苷酸,(ii)5'翼区(A')包含选自Gutb和Nm1n的经修饰的核苷酸,(iii)3'翼区(C')包含选自Gutb和Nm1n的经修饰的核苷酸,或者(iv)它们的任何组合。

[0021] 在一些实施例中,中心区(B')包含2、3、4、5个或6个或更多个经修饰的核苷酸。

[0022] 在一些实施例中,5'翼区(A')、3'翼区(C')或两者包含选自Gutb、Nm1n、G-夹和5prn1的经修饰的核苷酸。

[0023] 在一些实施例中,ASO分子进一步包含1个或多个硫代磷酸酯(ps)核苷间键、甲磺酰基磷酰胺酯(yp)核苷间键或它们的组合。

[0024] 在一些实施例中,ASO分子进一步包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21或22个硫代磷酸酯(ps)核苷间键、甲磺酰基磷酰胺酯(yp)核苷间键或它们的组合。

[0025] 在另一方面,本公开提供了包含14-22个核苷酸单元的反义寡核苷酸(ASO),其中该ASO包含:

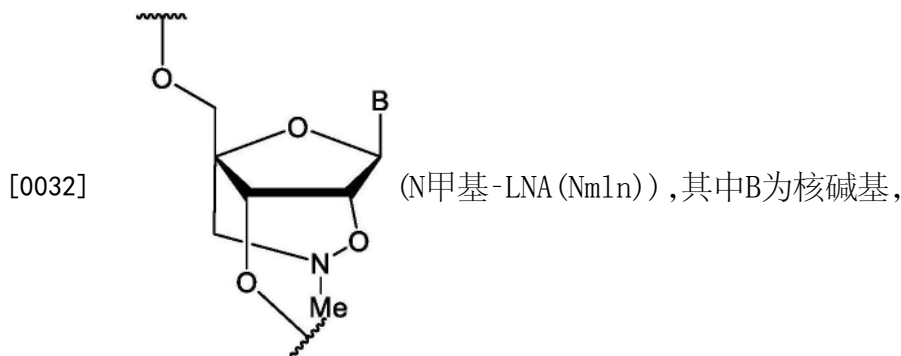
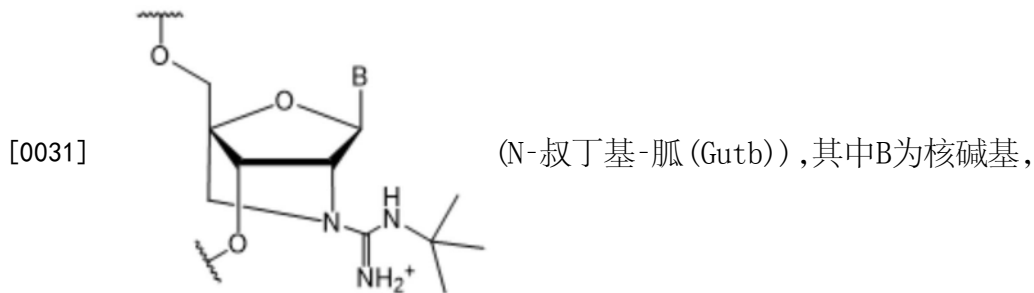
[0026] (a) 包含6个或更多个连续的DNA核苷酸的中心区(B'),其中连续的DNA核苷酸中的至少一个为经修饰的核苷酸,

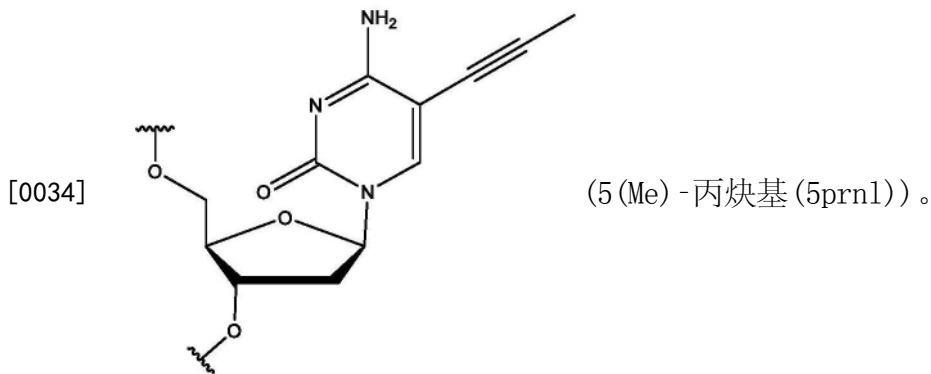
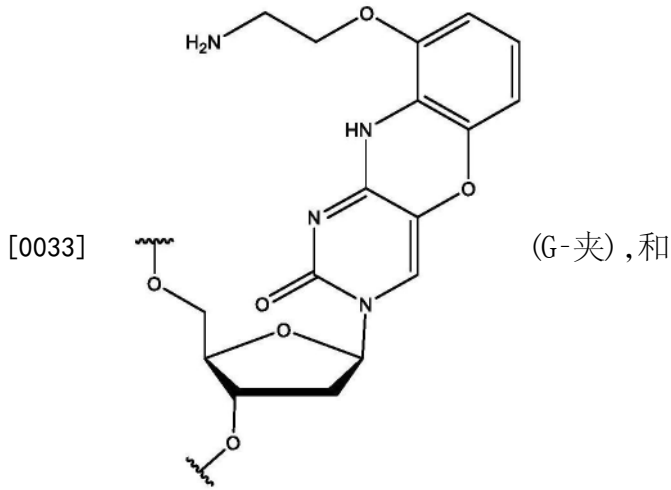
[0027] (b) 包含2至6个锁核苷酸或2'取代核苷的5'翼区(A'),和

[0028] (c) 包含2至6个锁核苷酸或2'取代核苷的3'翼区(C'),

[0029] 其中ASO的中心区与靶RNA序列至少80%互补或者杂交,并且其中ASO包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15个或更多个甲磺酰基磷酰胺酯(yp)核苷间键。

[0030] 在一些实施例中,ASO包含选自以下的至少1个、至少2个、至少3个、至少4个或至少5个或更多个核苷酸:



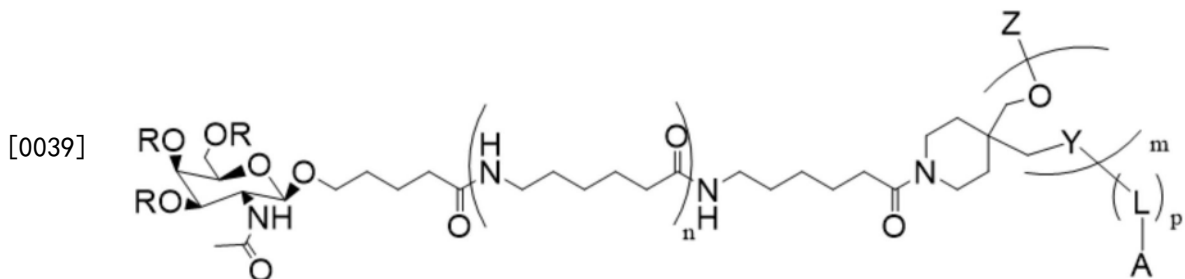


[0035] 在一些实施例中,ASO分子进一步包含1个或多个硫代磷酸酯 (ps) 核苷间键

[0036] 在前述方面中任一项的一些实施例中, (i) 至少一个甲磺酰基磷酰胺酯 (yp) 核苷酸间键位于从ASO分子的5'端起的核苷位置3与4之间; (ii) 至少一个甲磺酰基磷酰胺酯 (yp) 核苷酸间键位于从ASO分子的5'端起的核苷位置5与6之间; (iii) 至少一个甲磺酰基磷酰胺酯 (yp) 核苷酸间键位于从ASO分子的5'端起的核苷位置6与7之间; (iv) 至少一个甲磺酰基磷酰胺酯 (yp) 核苷酸间键位于从ASO分子的5'端起的核苷位置7与8之间; (v) 至少一个甲磺酰基磷酰胺酯 (yp) 核苷酸间键位于从ASO分子的5'端起的核苷位置8与9之间; (vi) 至少一个甲磺酰基磷酰胺酯 (yp) 核苷酸间键位于从ASO分子的5'端起的核苷位置9与10之间; 或者 (vii) 它们的组合。

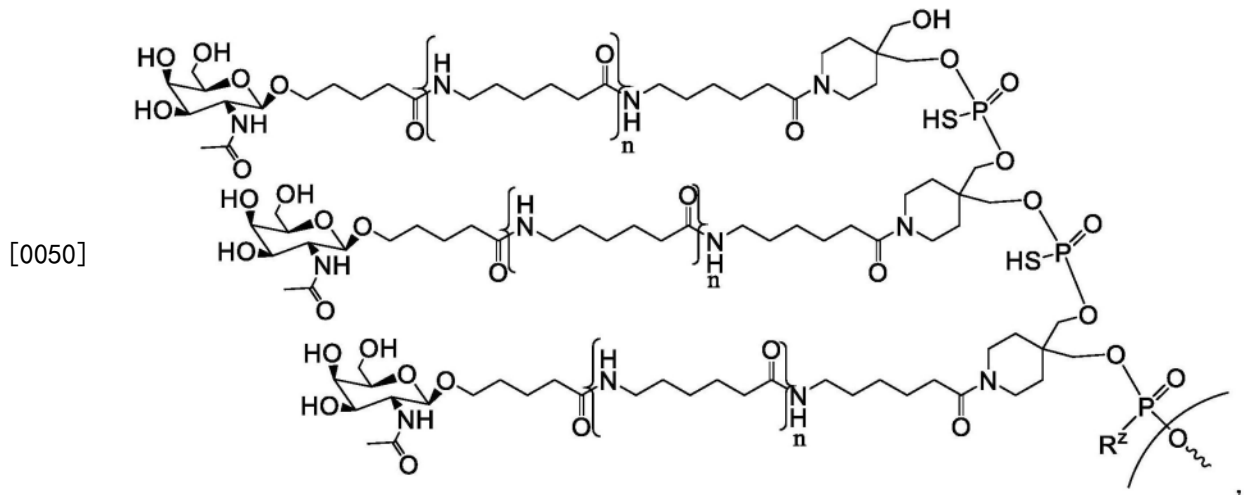
[0037] 在前述方面中任一项的一些实施例中,5'翼区 (A')、3'翼区 (C') 或两者包含至少一个甲磺酰基磷酰胺酯 (yp) 核苷酸间键。

[0038] 在前述方面中任一项的一些实施例中,ASO分子进一步包含半乳糖胺。在一些实施例中,半乳糖胺为式 (VI) 的N-乙酰半乳糖胺 (GalNAc) :



[0040] ,其中

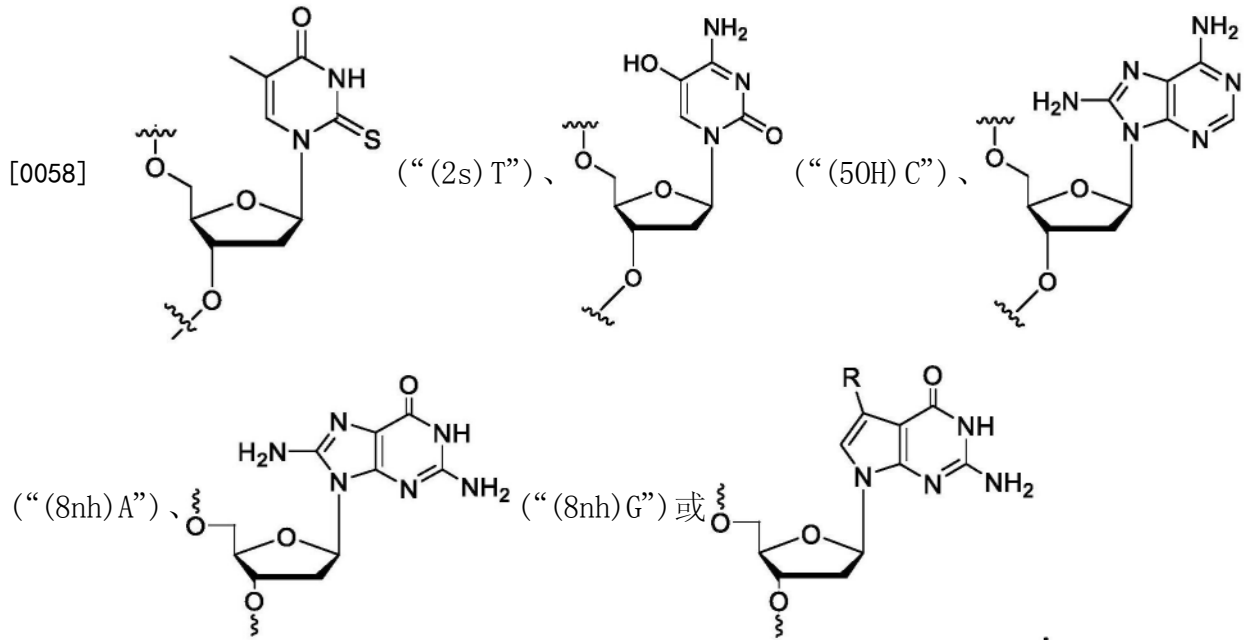
- [0041] m为1、2、3、4或5；  
 [0042] 每个n独立地为1或2；  
 [0043] p为0或1；  
 [0044] 每个R独立地为H；  
 [0045] 每个Y独立地选自 -O-P(=O)(SH)-、-O-P(=O)(O)-、-O-P(=O)(OH)- 和 -O-P(S)-；  
 [0046] Z为H或第二保护基团；  
 [0047] L为接头或者L和Y组合地为接头；并且  
 [0048] A为H、OH、第三保护基团、活化基团或寡核苷酸。  
 [0049] 在一些实施例中，半乳糖胺为式(VII)的N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)：



- [0051] 其中R<sup>2</sup>为OH或SH；并且每个n独立地为1或2。  
 [0052] 在前述方面中任一项的一些实施例中，(i) 靶RNA序列为病毒基因；(ii) 靶RNA序列为来自DNA病毒的基因；(iii) 靶RNA序列为来自双链DNA(dsDNA)病毒的基因；(iv) 靶RNA序列为来自嗜肝DNA病毒的基因；(v) 靶RNA序列为来自乙型肝炎病毒(HBV)的基因；(vi) 靶RNA序列为来自基因型A-J中的任一种的HBV的基因；或者(vii) 靶RNA序列选自HBV的S基因或X基因。  
 [0053] 在前述方面中任一项的一些实施例中，靶RNA序列选自编码甲基化控制的J蛋白(MCJ蛋白)的基因、编码TAZ的基因、编码血管生成素样3(ANGPTL3)的基因、编码二酰基甘油酰基转移酶2(DGAT2)的基因和编码羟基类固醇17-β脱氢酶13(HSD17B13)的基因。  
 [0054] 在前述方面中任一项的一些实施例中，其中(i) ASO的5'翼区包含2至6个硫代磷酸酯连接的锁核苷，(ii) ASO的3'翼区包含2至6个硫代磷酸酯连接的锁核苷，或者(iii) 它们的组合。在一些实施例中，其中锁核苷选自LNA、ScpBNA、AmNA、AmNA(N-Me)、GuNA、GuNA(N-R<sup>11</sup>)，其中R<sup>11</sup>选自Me、Et、i-Pr、t-Bu和它们的组合。  
 [0055] 在前述方面中任一项的一些实施例中，ASO的中心区包含至少5个连续的硫代磷酸酯连接的DNA核苷酸、至少5个连续的甲磺酰基磷酰胺酯连接的DNA核苷酸或至少5个连续的通过一个或多个硫代磷酸酯核苷间键和一个或多个甲磺酰基磷酰胺酯核苷间键连接的连续的DNA核苷酸。  
 [0056] 在前述方面中任一项的一些实施例中，ASO的中心区包含8至10个连续的硫代磷酸

酯连接的DNA核苷酸、8至10个连续的甲磺酰基磷酰胺酯连接的DNA核苷酸或8至10个通过一个或多个硫代磷酸酯核苷间键和一个或多个甲磺酰基磷酰胺酯核苷间键连接的DNA核苷酸。

[0057] 在前述方面中任一项的一些实施例中,ASO包含至少一个具有以下结构的经修饰的核苷酸

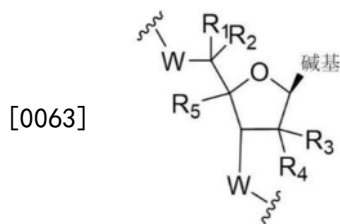


[0059] 其中:

[0060] R为卤素或R'-C≡C-;并且

[0061] R'为C<sub>6-12</sub>芳基、5元至12元杂芳基、羟基-C<sub>1-6</sub>烷基或C<sub>1-7</sub>烷酰基氧基。

[0062] 在前述方面中任一项的一些实施例中,ASO包含至少一个具有以下结构的经修饰的核苷酸:



[0064] 其中:

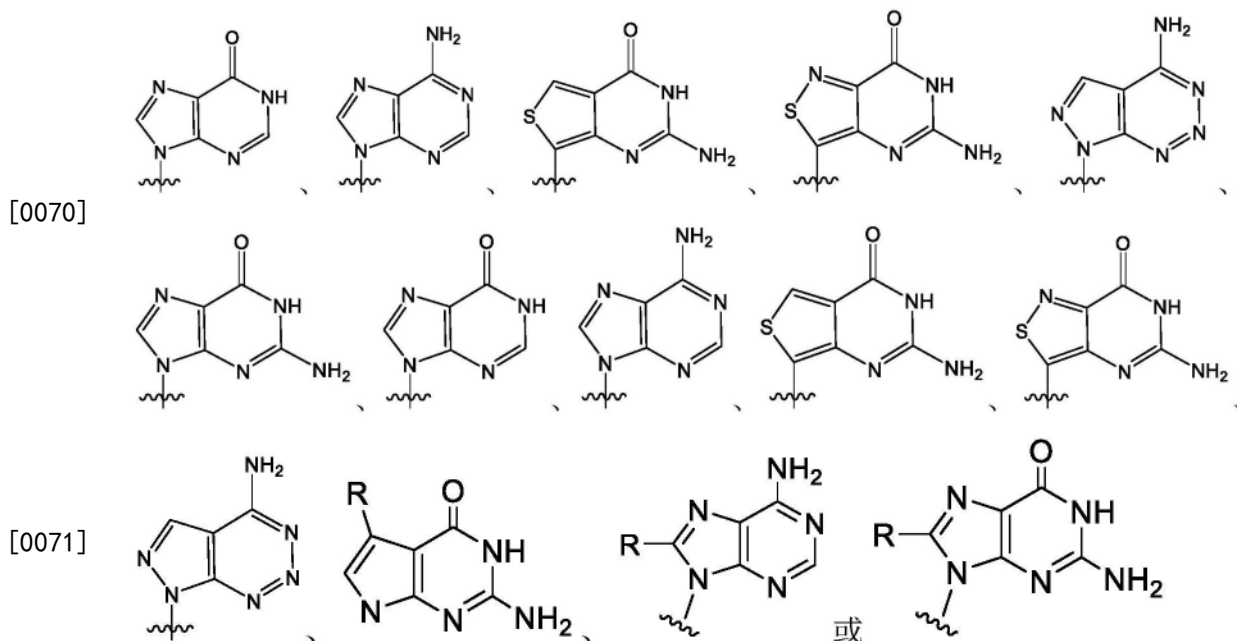
[0065] W独立地为O、N或S;

[0066] R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>和R<sub>5</sub>独立地为H或D;

[0067] R<sub>3</sub>为H或F;

[0068] R<sub>4</sub>为F或OCH<sub>3</sub>;并且

[0069] 碱基为



[0072] 其中:

[0073] R为卤素或R'-C≡C-;并且

[0074] R'代表C<sub>6-12</sub>芳基、5元至12元杂芳基、羟基C<sub>1-6</sub>烷基或C<sub>1-7</sub>烷酰基氧基。

[0075] 在另一方面,本公开提供了如表1中所示的ASO分子。

[0076] 在另一方面,本公开提供了包含本文所公开的ASO分子的药物组合物(例如,前述方面或实施例中的任一项);以及药学上可接受的赋形剂。

[0077] 在一些实施例中,药物组合物可进一步包含2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个本文所公开的ASO分子。

[0078] 在一些实施例中,药物组合物可进一步包含额外治疗剂。在一些实施例中,其中额外治疗剂选自核苷酸类似物、核苷类似物、衣壳组装调节剂(CAM)、重组干扰素、进入抑制剂、小分子免疫调节剂和寡核苷酸疗法,其中所述寡核苷酸疗法任选地选自额外反义寡核苷酸(ASO)、短干扰核酸(siNA)、NAP或STOPS™。

[0079] 在另一方面,本公开提供了治疗患有乙型肝炎病毒(HBV)感染的受试者的方法,该方法包括向患有HBV的受试者施用本文所公开的ASO或药物组合物(例如,前述方面或实施例中的任一项)。

[0080] 在一些实施例中,该方法可进一步包括施用额外治疗剂。在一些实施例中,其中额外治疗剂选自核苷酸类似物、核苷类似物、衣壳组装调节剂(CAM)、重组干扰素、进入抑制剂、小分子免疫调节剂和寡核苷酸疗法,其中所述寡核苷酸疗法任选地选自额外反义寡核苷酸(ASO)、短干扰核酸(siNA)、NAP或STOPS™。在一些实施例中,额外治疗剂选自由包含以下项组成的组:ALG-010133、ALG-000184、重组干扰素α2b、IFN-α、PEG-IFN-α-2a、拉米夫定、替比夫定、阿德福韦酯、克拉夫定、恩替卡韦、替诺福韦艾拉酚胺、替诺福韦二吡呋酯、NVR3-778、BAY41-4109、JNJ-632、JNJ-3989(ARO-HBV)、RG6004、GSK3228836、REP-2139、REP-2165、AB-729、VIR-2218、DCR-HBVS、JNJ-6379、GLS4、ABI-H0731、JNJ-440、NZ-4、RG7907、EDP-514、AB-423、AB-506、ABI-H03733和ABI-H2158。在一些实施方案中,ASO和额外治疗剂同时地或相继地施用。

[0081] 在一些实施例中,治疗包括降低受试者中的HBV病毒载量、降低受试者中的病毒抗原水平或它们的组合。

[0082] 在另一方面,本公开提供了降低受试者中靶基因的表达的方法,该方法包括向受试者施用本文所公开的ASO或药物组合物。在一些实施例中,靶基因对于受试者是内源性的基因或者靶基因对于受试者不是内源性的。在一些实施例中,受试者患有选自乙型肝炎病毒(HBV)、冠状病毒感染和肝病的疾病,其中该肝病任选地选自非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)和肝细胞癌(HCC)。

[0083] 在所公开方法的一些实施例中,受试者为哺乳动物,任选地为成年人。

[0084] 在所公开方法的一些实施例中,ASO以至少1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg、10mg/kg、11mg/kg、12mg/kg、13mg/kg、14mg/kg或15mg/kg的剂量施用。

[0085] 在所公开方法的一些实施例中,ASO以0.5mg/kg至50mg/kg、0.5mg/kg至40mg/kg、0.5mg/kg至30mg/kg、1mg/kg至50mg/kg、1mg/kg至40mg/kg、1mg/kg至30mg/kg、1mg/kg至20mg/kg、3mg/kg至50mg/kg、3mg/kg至40mg/kg、3mg/kg至30mg/kg、3mg/kg至20mg/kg、3mg/kg至15mg/kg、3mg/kg至10mg/kg、4mg/kg至50mg/kg、4mg/kg至40mg/kg、4mg/kg至30mg/kg、4mg/kg至20mg/kg、4mg/kg至15mg/kg、4mg/kg至10mg/kg、5mg/kg至50mg/kg、5mg/kg至40mg/kg、5mg/kg至30mg/kg、5mg/kg至20mg/kg、5mg/kg至15mg/kg或5mg/kg至10mg/kg之间的剂量施用。

[0086] 在所公开方法的一些实施例中,至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10次施用ASO。

[0087] 在所公开方法的一些实施例中,一天至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10次,一周至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10次,或者一个月至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10次施用ASO。

[0088] 在所公开方法的一些实施例中,每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21天至少一次施用ASO。

[0089] 在所公开方法的一些实施例中,持续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21天,或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、51、52、53、54或55周的时间段施用ASO。

[0090] 前述大体描述及以下详细描述为示例性的及阐释性的,并且旨在提供对所要求保护的本公开的进一步阐释。根据以下对附图的简要描述和本公开的详细描述,其他目的、优点和新颖特征对于本领域技术人员来说将是显而易见的。

## 附图说明

[0091] 该图(The Fig)示出了所选ASO相对于LNA-DNA-LNA亲本的体内效力的改善。G01为媒介物,以5mL/kg剂量SC;G02为ASO 59,在第0天以5mg/kg的剂量SC一次;G-04为ASO 84,在第0天以5mg/kg的剂量SC一次。

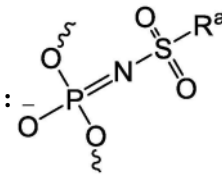
## 具体实施方式

[0092] 本公开涉及经修饰的反义寡核苷酸和经修饰的反义寡核苷酸的药物组合物。本公开还涉及使用和制备反义寡核苷酸和药物组合物的方法。

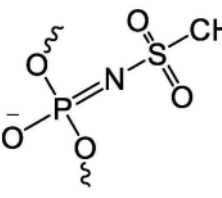
[0093] 反义寡核苷酸 (ASO)

[0094] 本公开的化合物包括经修饰的反义寡核苷酸 (ASO)。在一些实施例中, ASO 包含 14-22 个核苷酸单元, 例如 14、15、16、17、18、19、20、21 或 22 个核苷酸单元。在一些实施例中, ASO 为包含以下三个区的间隔体: 包含经修饰的核苷酸的 5' 翼区 (A'); 包含与翼不同类型的核苷酸 (例如能够诱导 RNA 酶 H 裂解的核苷酸) 的中心区 (B'); 以及包含经修饰的核苷酸的 3' 翼区 (C')。

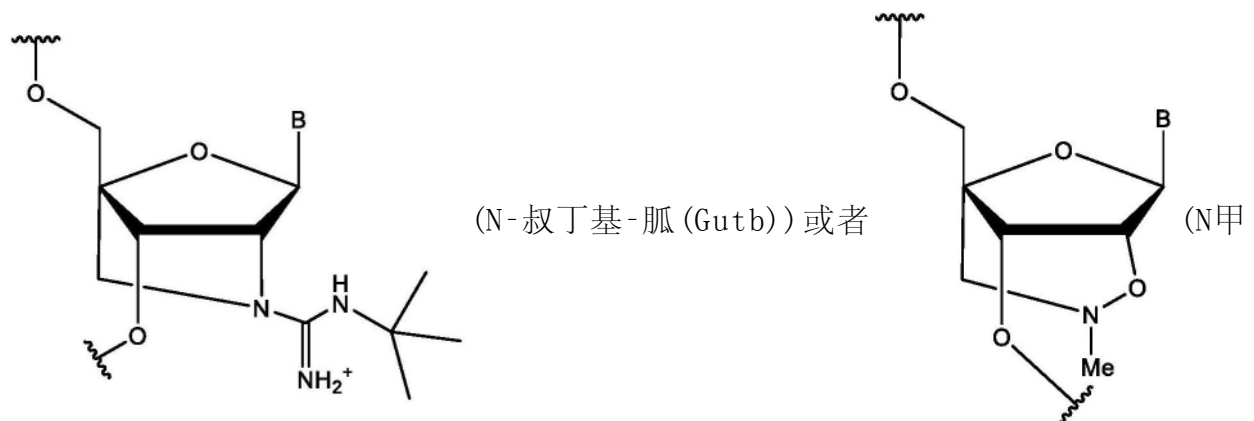
[0095] 所公开的 ASO 包含 (i) 经修饰的核苷酸, 诸如 Gutb、Nm1n、5prn1、G-夹或它们的组合; (ii) 至少一个甲磺酰基磷酰胺酯核苷间键 (当 R<sup>a</sup> 为甲基基团时, 在序列中称为 “yp”); 或 (iii) 它们的组合。Gutb、Nm1n、5prn1 和 G-夹的结构如下所示, 并且甲磺酰基磷酰胺酯接头的

的结构为:  其中 R<sup>a</sup> 为 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基、C<sub>6-12</sub> 芳基或 5 元至 12 元杂芳基。

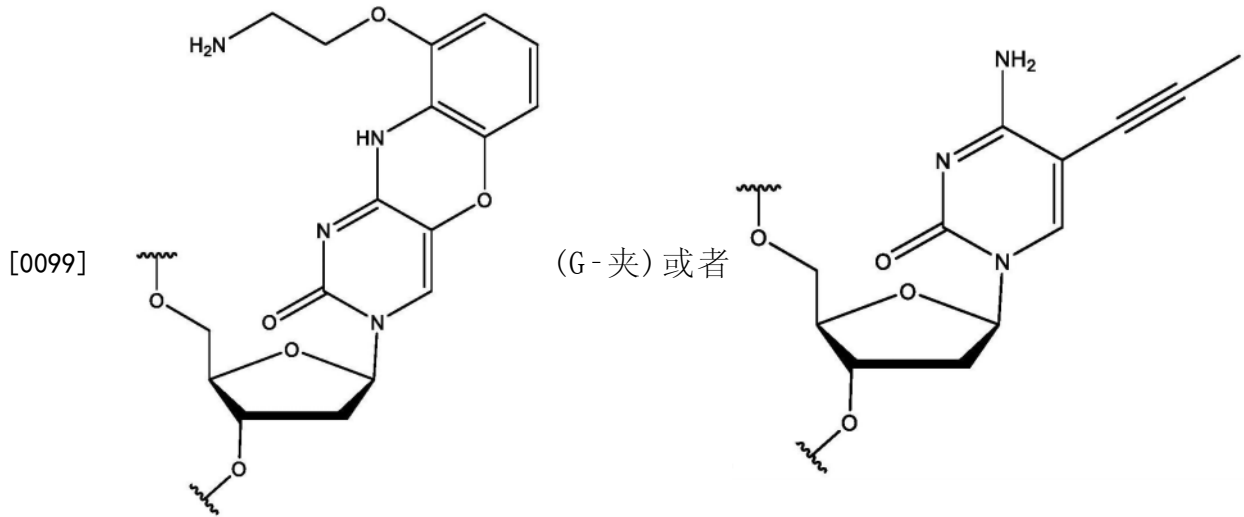
[0096] 在一些实施例中, 甲磺酰基磷酰胺酯接头的结构为:

[0097]  (yp)。

[0098] 例如, 5' 翼区和 3' 翼区可各自独立地包含 2-6 个核苷酸, 例如 2、3、4、5 或 6 个核苷酸。这些核苷酸中的一个或多个核苷酸可以是经修饰的 (例如, 1、2、3、4、5 或 6 个核苷酸是经修饰的)。经修饰的核苷酸中的至少一个经修饰的核苷酸可以包含以下结构:

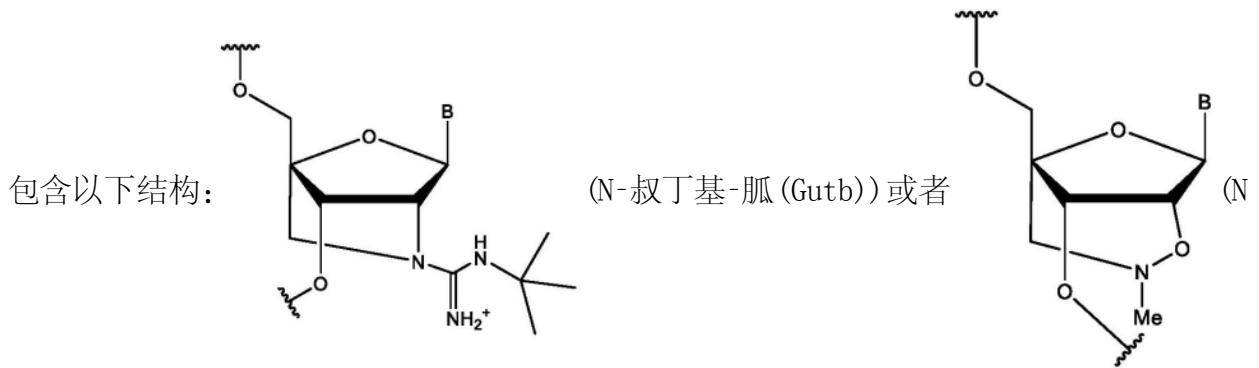


基-LNA (Nm1n)), 其中 B 为核碱基。另外地或替代性地, 经修饰的核苷酸中的至少一个经修饰的核苷酸可以包含以下结构:



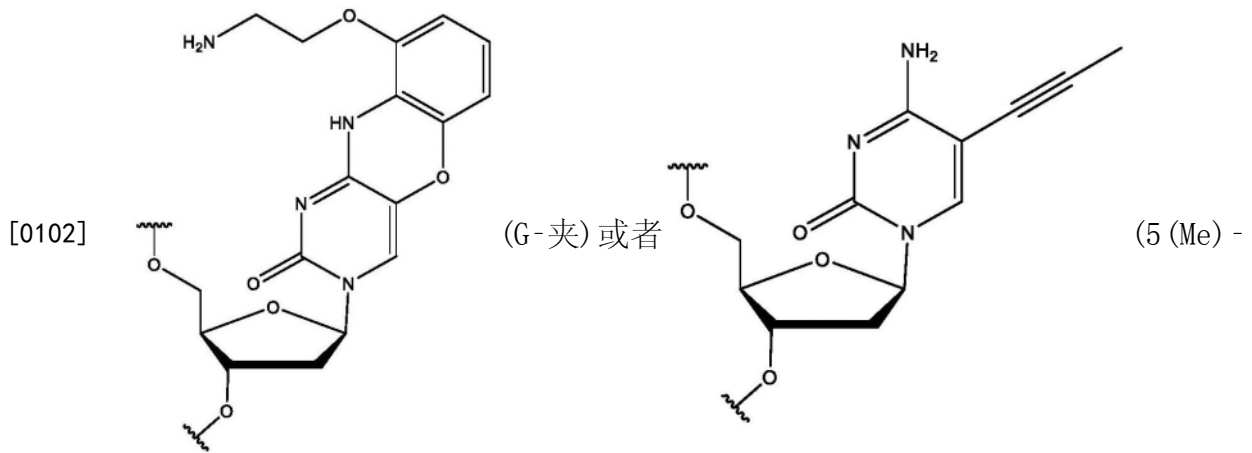
(5(Me)-丙炔基 (5prn1))。因此,5'翼区和3'翼区可各自独立地包含Gutb、Nm1n或两者中的一者或多者。类似地,5'翼区和3'翼区可各自独立地包含G-夹、5prn1或两者中的一者或多者;然而,G-夹和5prn1也适合于包含在中心区中。例如,在一些实施例中,(i)中心区(B')包含选自G-夹和5prn1的经修饰的核苷酸,(ii)5'翼区(A')包含选自Gutb和Nm1n的经修饰的核苷酸,(iii)3'翼区(C')包含选自Gutb和Nm1n的经修饰的核苷酸,或者(iv)它们的任何组合。

[0100] 另外地或替代性地,中心区可包含通过磷酸二酯核苷间键或硫代磷酸酯(“ps”)核苷间键连接的1、2、3、4、5或更多个连续的DNA核苷。在其他实施例中,中心区包含一个或多个经修饰的核苷酸、甲磺酰基磷酰胺酯(yp)核苷间键或它们的组合。进一步地,中心区可以包含一个或多个经修饰的核苷酸,其中中心区能够诱导RNA酶H裂解。在一些实施例中,中心区包含一个或多个具有经修饰的核碱基的经修饰的核苷酸。在一些实施例中,中心区包含6、7、8、9、10或11个连续的DNA核苷。在一些实施例中,中心区中的DNA核苷的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或11个DNA核苷是经修饰的。经修饰的核苷酸中的至少一个经修饰的核苷酸可以



甲基-LNA (Nm1n)),

[0101] 其中B为核碱基。另外地或替代性地,经修饰的核苷酸中的至少一个经修饰的核苷酸可以包含以下结构:



丙炔基 (5prnl)。

[0103] 为了本公开的目的,所公开的ASO可以包含Gutb、Nmln、5prnl、G-夹或它们的组合中的至少1者、至少2者、至少3者、至少4者或至少5者或更多者。Gutb、Nmln、5prnl、G-夹或它们的组合可并入到中心区、翼区或两者中。一般而言,经修饰的锁核苷酸(Gutb和Nmln)适合包含在翼区中,而5prnl和G-夹适合包含在整个ASO或具体是在中心区中。另外地或替代性地,所公开的ASO可包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15个或更多个甲磺酰基磷酸酯(y<sub>p</sub>)核苷间键。

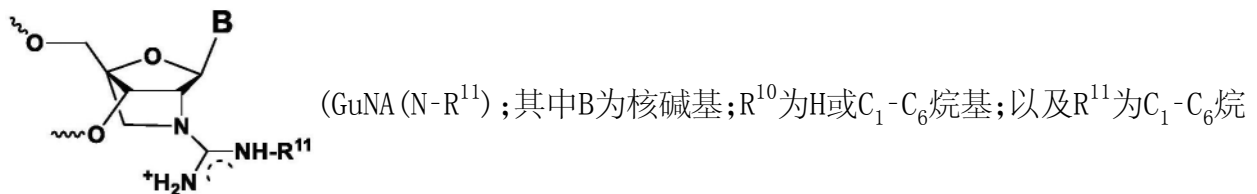
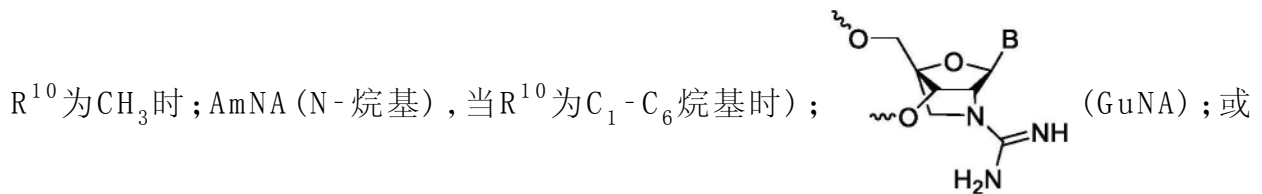
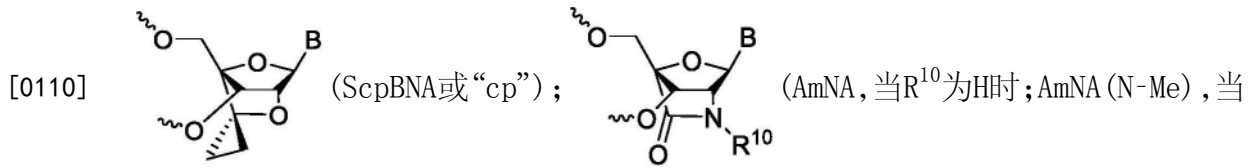
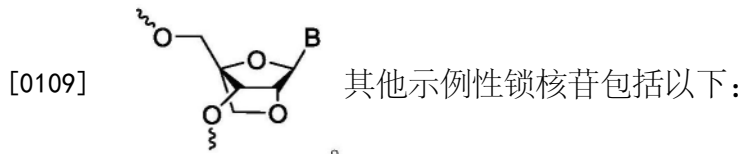
[0104] 在一些方面,本公开的间隔体ASO化合物包括式(I)的化合物:

[0105] A'—B'—C',

[0106] 其中A'和C'各自独立地包含2-6个核苷酸,其中一个或多个是经修饰的核苷酸,B'包含通过磷酸二酯或硫代磷酸酯核苷间键连接的6个或更多个连续的DNA核苷。在一些实施例中,B'包含一个或多个经修饰的DNA核苷。在一些实施例中,经修饰的核苷酸选自锁核苷或2'取代核苷。在一些实施例中,经修饰的DNA核苷选自锁核苷或2'取代核苷。

[0107] A'、B'和C'中的核苷酸和/或核苷的数量可以选自下组(A':B':C'): (2:10:2)、(2:10:3)、(2:10:4)、(2:10:5)、(3:10:2)、(3:10:3)、(3:10:4)、(3:10:5)、(4:10:2)、(4:10:3)、(4:10:4)、(4:10:5)、(5:10:2)、(5:10:3)、(5:10:4)、(5:10:5)、(2:9:2)、(2:9:3)、(2:9:4)、(2:9:5)、(3:9:2)、(3:9:3)、(3:9:4)、(3:9:5)、(4:9:2)、(4:9:3)、(4:9:4)、(4:9:5)、(5:9:2)、(5:9:3)、(5:9:4)、(5:9:5)、(2:8:2)、(2:8:3)、(2:8:4)、(2:8:5)、(3:8:2)、(3:8:3)、(3:8:4)、(3:8:5)、(4:8:2)、(4:8:3)、(4:8:4)、(4:8:5)、(5:8:2)、(5:8:3)、(5:8:4)、(5:8:5)、(2:7:2)、(2:7:3)、(2:7:4)、(2:7:5)、(3:7:2)、(3:7:3)、(3:7:4)、(3:7:5)、(4:7:2)、(4:7:3)、(4:7:4)、(4:7:5)、(5:7:2)、(5:7:3)、(5:7:4)、(5:7:5)、(2:6:2)、(2:6:3)、(2:6:4)、(2:6:5)、(3:6:2)、(3:6:3)、(3:6:4)、(3:6:5)、(4:6:2)、(4:6:3)、(4:6:4)、(4:6:5)、(5:6:2)、(5:6:3)、(5:6:4)和(5:6:5)。

[0108] 在一些实施例中,5'翼区包含一个或多个锁核苷或2'取代核苷。在一些实施例中,3'翼区包含一个或多个锁核苷或2'取代核苷。在一些实施例中,中心区包含一个或多个锁核苷或2'取代核苷。在一些实施例中,5'翼区、3'翼区、中心区或它们的组合包含一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15)锁核苷或2'取代核苷。锁核苷可含有糖的4'与2'位置之间的桥接,其中所述桥接包含2至4个任选的取代原子。例如,LNA核苷为:



基。在某些实施例中，5'翼区中的所有核苷都是锁核苷。在一些实施例中，3'翼区中的所有核苷都是锁核苷。在一些实施例中，3'翼区包含LNA和选自ScpBNA、AmNA和GuNA的一个或两个核苷。在一些实施例中，5'翼区均为LNA，并且3'翼区含有LNA和选自ScpBNA、AmNA和GuNA的一个或两个核苷。其他核苷酸包括在PCT/JP2010/068409、PCT/JP2013/075370、PCT/JP2015/054308、PCT/JP2018/006061和/或PCT/JP2018/006062中，其以引用方式整体并入本文。Gutb和NmIn是可包括在5'翼区或3'翼区或两者中的锁核苷酸的另外的实例。

[0111] 在一些实施例中，ASO的5'翼区包含2至6个硫代磷酸酯连接的锁核苷、甲磺酰基磷酸酰胺酯连接的锁核苷或它们的组合。在一些实施例中，5'翼区包含2至6个硫代磷酸酯连接的2'取代核苷、甲磺酰基磷酸酰胺酯连接的2'取代核苷或它们的组合。在一些实施例中，5'翼区包含至少一个锁核苷和至少一个2'取代核苷，其中锁核苷和2'取代核苷通过硫代磷酸酯接头或甲磺酰基磷酸酰胺酯接头连接。在一些实施例中，5'翼区进一步包含RNA核苷或DNA核苷，其中RNA核苷和DNA核苷不是锁核苷或2'取代核苷。在一些实施例中，5'翼区的至少两个核苷通过硫代磷酸酯接头或甲磺酰基磷酸酰胺酯接头连接。在一些实施例中，5'翼区的至少2、3、4、5或6个核苷通过硫代磷酸酯接头、甲磺酰基磷酸酰胺酯接头或它们的组合连接。

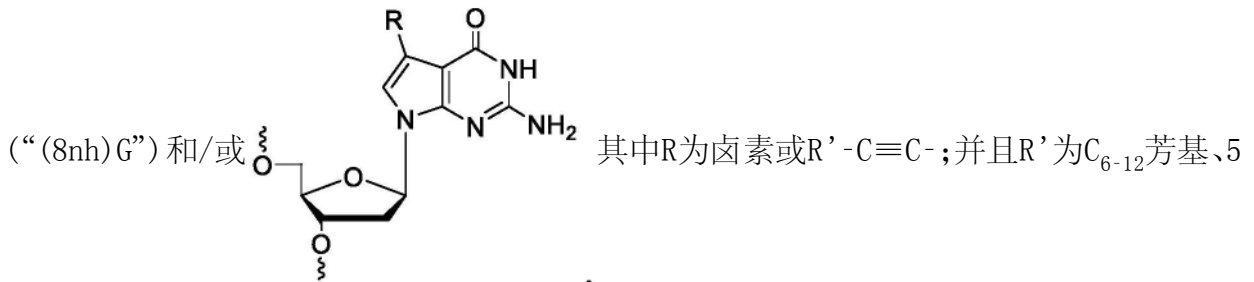
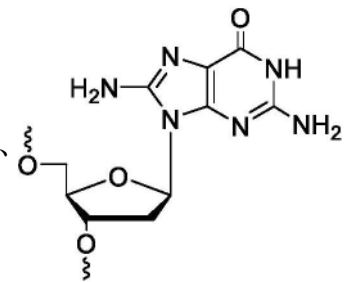
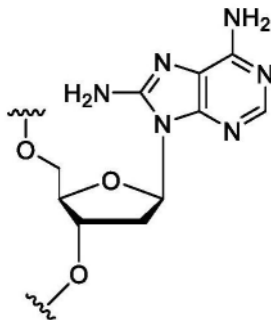
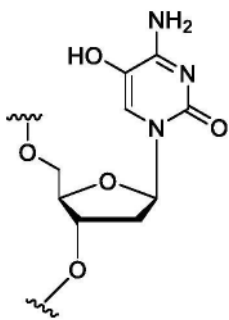
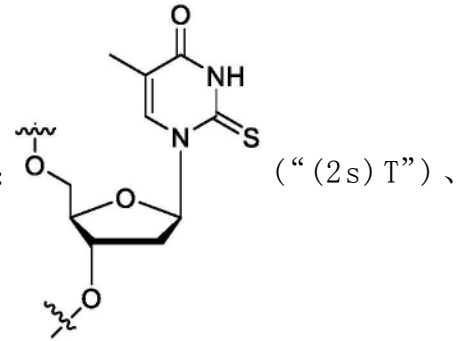
[0112] 在一些实施例中，ASO的3'翼区包含2至6个硫代磷酸酯连接的锁核苷、甲磺酰基磷酸酰胺酯连接的锁核苷或它们的组合。在一些实施例中，3'翼区包含2至6个硫代磷酸酯连接的取代核苷、甲磺酰基磷酸酰胺酯连接的取代核苷或它们的组合。在一些实施例中，3'翼区包含至少一个锁核苷和至少一个2'取代核苷，其中锁核苷和2'取代核苷通过硫代磷酸酯接头或甲磺酰基磷酸酰胺酯接头连接。在一些实施例中，3'翼区进一步包含RNA核苷或DNA核苷，其中RNA核苷和DNA核苷不是锁核苷或2'取代核苷。在一些实施例中，3'翼区的至少两个核苷通过硫代磷酸酯接头或甲磺酰基磷酸酰胺酯接头连接。在一些实施例中，3'翼区的至少2、3、4、5或6个核苷通过硫代磷酸酯接头、甲磺酰基磷酸酰胺酯接头或它们的组合连接。

[0113] 在一些实施例中，5'翼区和/或3'翼区中的一个或多个核苷酸包含硫代磷酸核苷

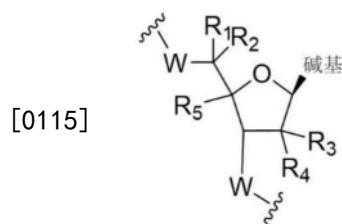
间键或甲磺酰基磷酸酯核苷间键。在一些实施例中,5'翼区中的所有核苷酸均包含硫代磷酸核苷间键。在一些实施例中,3'翼区中的所有核苷酸均包含硫代磷酸核苷间键。在一些实施例中,5'翼区中的所有核苷酸均包含甲磺酰基磷酸酯核苷间键。在一些实施例中,3'翼区中的所有核苷酸均包含甲磺酰基磷酸酯核苷间键。

[0114] 在一些实施例中,中心区包含一个或多个具有经修饰的核碱基的经修饰的核苷酸。例如,中心区可包含Gutb、Nm1n、5prn1、G-夹或它们的组合中的至少1者、至少2者、至少3者、至少4者或至少5者或更多者。在一些实施例中,中心区包含5prn1、G-夹或它们的组合中的至少1者、至少2者、至少3者、至少4者或至少5者或更多者。另外地或替代性地,中心区可

以包含具有以下结构的一个或多个经修饰的核苷酸:



元至12元杂芳基、羟基-C<sub>1-6</sub>烷基或C<sub>1-7</sub>烷酰基氧基。在一些实施例中,中心区包含在(从5'端起)第1、第2、第3或第4间隙核苷位置处的一个经修饰的核苷酸(例如,(2s) T或(50H) C)。在一些实施例中,经修饰的核苷酸在(从5'端起)第3间隙核苷位置处。在一些实施例中,经修饰的核苷酸为具有以下结构的核苷酸:



[0116] 其中:

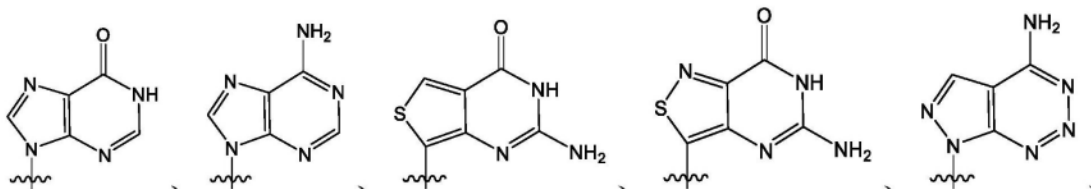
[0117] W独立地为O、N或S；

[0118]  $R_1$ 、 $R_2$ 和 $R_5$ 独立地为H或D；

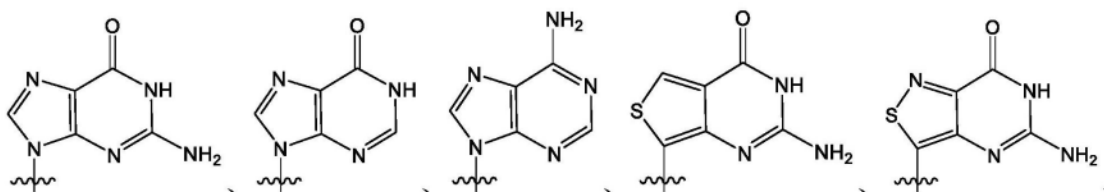
[0119]  $R_3$ 为H或F；

[0120]  $R_4$ 为F或 $OCH_3$ ；并且

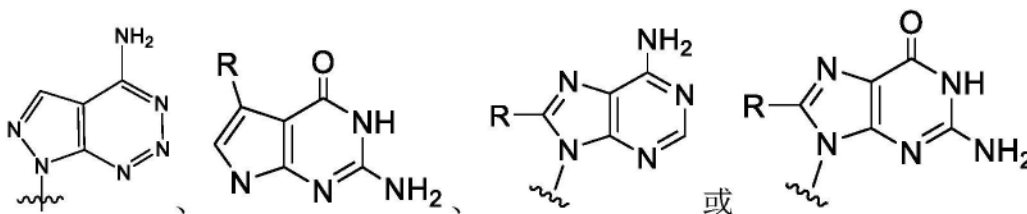
[0121] 碱基为



[0122]



[0123]



[0124] 其中：

[0125] R为卤素或 $R'-C\equiv C-$ ；并且

[0126]  $R'$ 代表 $C_{6-12}$ 芳基、5元至12元杂芳基、羟基 $C_{1-6}$ 烷基或 $C_{1-7}$ 烷酰基氧基。在一些实施例中， $C_{1-7}$ 烷酰基包括但不限于甲酰基、乙酰基、乙基羰基、正丙基羰基、异丙基羰基、正丁基羰基、异丁基羰基、叔丁基羰基、正戊基羰基和正己基羰基。其他经修饰的核苷酸包括PCT/JP2018/006061中的那些，其以引用方式整体并入本文。

[0127] 如本文所用，除非另有说明，“芳基(aryl)”是指具有完全离域 $\pi$ 电子系统的碳环(全碳)环。“芳基”基团可以由两个或更多个稠环(共享两个相邻碳原子的环)组成。当芳基为稠环系统时，则与分子的其余部分连接的环具有完全离域的 $\pi$ 电子系统。稠环系统中的其他环可能具有或可能不具有完全离域的 $\pi$ 电子系统。芳基基团的实例包括但不限于苯、萘和甘菊环的自由基。

[0128] 如本文所用，除非另有说明，“杂芳基(heteroaryl)”是指具有完全离域 $\pi$ 电子系统的环，并且含有在环中独立地选自氮、氧和硫组成的基团的一个或多个杂原子(例如，一至三个杂原子，或一至四个杂原子，或一至五个杂原子)。“杂芳基”基团可以由两个或更多个稠环(共享两个相邻碳原子的环)组成。当杂芳基为稠环系统时，则与分子的其余部分连接的环具有完全离域的 $\pi$ 电子系统。稠环系统中的其他环可能具有或可能不具有完全离域的 $\pi$ 电子系统。杂芳基环的实例包括但不限于呋喃、噻吩、吡咯、噁唑、噻唑、咪唑、吡唑、异噁唑、异噻唑、三唑、噻二唑、吡啶、哒嗪、嘧啶、吡嗪和三嗪。

[0129] 在一些实施例中，ASO的中心区包含至少5个连续的硫代磷酸酯连接的DNA核苷、至少5个连续的甲磺酰基磷酰胺酯连接的DNA核苷或它们的组合。在一些实施例中，中心区的

至少2、3、4、5或6个核苷通过硫代磷酸酯接头、甲磺酰基磷酰胺酯接头或它们的组合连接。在一些实施例中,中心区的DNA核苷通过硫代磷酸酯接头或甲磺酰基磷酰胺酯接头连接到5'翼区的核苷。在一些实施例中,中心区的DNA核苷通过硫代磷酸酯接头或甲磺酰基磷酰胺酯接头连接到3'翼区的核苷。在一些实施例中,中心区包含8至10个连续的硫代磷酸酯连接的DNA核苷、8-10个连续的甲磺酰基磷酰胺酯连接的DNA核苷或它们的组合。

[0130] 在一些实施例中,ASO与开始于HBV的X区或HBV的S区的病毒靶RNA序列互补或杂交。例如,重要的靶可以从acc.KC315400.1(基因型B,“gt B”),或基因型A、C或D中的任一者中的靶位点的5'端处开始。技术人员将理解HBV位置,例如,如Wing-Kin Sung等人,Nature Genetics 44:765(2012)中所描述的。在一些实施例中,S区被定义为从小S蛋白的开始(在基因型B KC315400.1分离物中,位置#155)到X蛋白的开始(在基因型B KC315400.1分离物中,位置#1373)之前。在一些实施例中,X区被定义为从X蛋白的开始(在基因型B KC315400.1分离物中,位置#1374)到DR2位点的结束(在基因型B KC315400.1分离物中,位置#1603)。

[0131] 在一些实施例中,ASO与病毒靶RNA序列互补或者杂交,该病毒靶RNA序列包含由至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个组成的或基本上由其组成的位于SEQ ID NO:89的位置100-800或1050-1700内的连续的核苷酸。在一些实施例中,ASO与病毒靶RNA序列互补或者杂交,该病毒靶RNA序列包含由5至15、5至14、5至13、5至12、5至11、5至10、5至9、5至8、6至15、6至14、6至13、6至12、6至11、6至10、7至15、7至14、7至13、7至12或7至11个组成的或基本上由其组成的位于SEQ ID NO:89的位置100-800或1050-1700内的连续的核苷酸。在一些实施例中,ASO与病毒靶RNA序列互补或者杂交,该病毒靶RNA序列包含由至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个组成的或基本上由其组成的位于SEQ ID NO:89的位置180-280、300至450、650至775、1125至1300或1400至1650内的连续的核苷酸。在一些实施例中,ASO与病毒靶RNA序列互补或者杂交,该病毒靶RNA序列包含由至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个组成的或基本上由其组成的位于SEQ ID NO:89的位置180至215、230至270、350至420、675至730、1165至1210、1245至1290、1400至1480或1500至1630内的连续的核苷酸。在一些实施例中,ASO与病毒靶RNA序列互补或者杂交,该病毒靶RNA序列包含由至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个组成或基本上由其组成的从SEQ ID NO:89的位置191、245、246、276、376、377、381、383、694、700、1182、1261、1262、1408、1410、1426、1431、1432、1433、1435、1438、1441、1443、1513、1516、1517、1518、1519、1520、1521、1522、1527、1559、1575、1576、1577、1580、1581、1582或1589处起始的连续的核苷酸。在一些实施例中,ASO与病毒靶RNA序列完全互补。在一些实施例中,ASO与病毒靶序列之间存在小于或等于5、4、3、2或1个错配。在一些实施例中,ASO与病毒靶序列之间存在小于或等于2个错配。在一些实施例中,ASO与病毒靶序列之间存在小于或等于1个错配。在一些实施例中,错配位于ASO的翼区。在一些实施例中,错配位于ASO的5'翼区。在一些实施例中,错配位于ASO的3'翼区。在一些实施例中,错配位于ASO的中心区。

[0132] 在一些实施例中,中心区与病毒靶RNA序列互补或者杂交,该病毒靶RNA序列包含由至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个组成的或基本上由其组成的位于SEQ ID NO:89的位置100-800或1050-1700内的连续的核苷酸。在一些实施例中,中心区与病毒靶RNA序列互补或者杂交,该病毒靶RNA序列包含由5至15、5至14、5至13、5至12、5至11、5至10、5至9、5

至8、6至15、6至14、6至13、6至12、6至11、6至10、7至15、7至14、7至13、7至12或7至11个组成的或基本上由其组成的位于SEQ ID NO:89的位置100-800或1050-1700内的连续的核苷酸。在一些实施例中,中心区与病毒靶RNA序列互补或者杂交,该病毒靶RNA序列包含由至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个组成的或基本上由其组成的位于SEQ ID NO:89的位置180-280、300至450、650至775、1125至1300或1400至1650内的连续的核苷酸。在一些实施例中,中心区与病毒靶RNA序列互补或者杂交,该病毒靶RNA序列包含由至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个组成的或基本上由其组成的位于SEQ ID NO:89的位置180至215、230至270、350至420、675至730、1165至1210、1245至1290、1400至1480或1500至1630内的连续的核苷酸。在一些实施例中,中心区与病毒靶RNA序列互补或者杂交,该病毒靶RNA序列包含由至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个组成或基本上由其组成的从SEQ ID NO:89的位置191、245、246、276、376、377、381、383、694、700、1182、1261、1262、1408、1410、1426、1431、1432、1433、1435、1438、1441、1443、1513、1516、1517、1518、1519、1520、1521、1522、1527、1559、1575、1576、1577、1580、1581、1582或1589处起始的连续的核苷酸。在一些实施例中,中心区与病毒靶RNA序列完全互补。在一些实施例中,中心区与病毒靶序列之间存在小于或等于5、4、3、2或1个错配。在一些实施例中,中心区与病毒靶序列之间存在小于或等于2个错配。在一些实施例中,中心区与病毒靶序列之间存在小于或等于1个错配。

[0133] 在一些实施例中,ASO包含与选自表1中所列出的序列的核苷酸序列至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或100%相同的核苷酸序列。

[0134] 在一些实施例中,本公开的ASO可具有与表1的ASO相差一个核苷的序列。在一些实施例中,本公开的ASO可具有与表1的ASO相差两个核苷的序列。在一些实施例中,本公开的ASO可具有与表1的ASO相差三个核苷的序列。在一些实施例中,本公开的ASO可具有与表1的ASO相差四个核苷的序列。

[0135] 在一些实施例中,本公开的ASO可以具有表1的序列,但是中心区中的一个T被(2s) T替代,中心区中的一个C被(50H) C替代,和/或中心区中的一个A被(8nh) A替代。在一些实施例中,本公开的ASO可具有表1的序列,但在5'翼部分中具有一个或两个ScpBNA、AmNA或GuNA。在一些实施例中,本公开的ASO可具有表1的序列,但在3'翼部分中具有一个或两个ScpBNA、AmNA或GuNA。在一些实施例中,本公开的ASO可具有表1的序列,但将mA或mU附加到序列的5'端。在一些实施例中,本公开的ASO可具有表1的序列,但将mA或mU附加到序列的5'端、序列的3'端或两者,其连接到GalNAc衍生物(例如,GalNAc4,诸如GalNAc4-(PS)2-p-;或者GalNAc6,诸如GalNAc6-(PS)2-p-),如本文详述。

[0136] 在一些实施例中,ASO包含与SEQ ID NOs:1-88中任一个的核苷酸序列至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或100%相同的核苷酸序列。

[0137] 在一些实施例中,本公开的ASO具有与SEQ ID NOs:1-88的核苷酸的任一个相差一个核苷的序列。在其他实施例中,ASO具有与SEQ ID NOs:1-88的核苷酸的任一个相差1、2、3或4个核苷的序列。在一些实施例中,本公开的ASO具有SEQ ID NOs:1-88中任一个的序列,但中心区中的一个T被(2s) T替代,中心区中的一个C被(50H) C,和/或中心区中的一个A被(8nh) A替代。在一些实施例中,本公开的ASO具有SEQ ID NOs:1-88中任一个的序列,但在5'

翼部分具有一个或两个ScpBNA、AmNA或GuNA。在一些实施例中,本公开的ASO具有SEQ ID NOs:1-88中任一个的序列,但在3'翼部分具有一个或两个ScpBNA、AmNA或GuNA。在一些实施例中,本公开的ASO具有SEQ ID NOs:1-88中任一个的序列,但将mA或mU附加到序列的5'端。在一些实施例中,本公开的ASO具有SEQ ID NOs:1-88中任一个的序列,但将mA或mU附加到序列的5'端,其连接到GalNAc衍生物(例如,GalNAc4,诸如GalNAc4-(PS)2-p-;或者GalNAc6,诸如GalNAc6-(PS)2-p-),如本文详述。

[0138] 靶RNA序列

[0139] 所公开的ASO可以通过募集RNA酶H来裂解和降解靶RNA序列的RNA转录物,降低RNA水平,并且从而降低由靶RNA序列编码的蛋白质的水平来降低靶RNA序列(例如,靶基因)的表达。

[0140] 出于本公开的目的,靶RNA序列可以是细胞中的任何基因。在一些实施例中,靶基因为病毒基因。在一些实施例中,病毒基因来自DNA病毒。在一些实施例中,DNA病毒为双链DNA(dsDNA)病毒。在一些实施例中,dsDNA病毒为嗜肝DNA病毒。在一些实施例中,嗜肝DNA病毒为乙型肝炎病毒(HBV)。在一些实施例中,HBV选自HBV基因型A-J。在一些实施方案中,病毒性疾病是由RNA病毒引起的。在一些实施例中,RNA病毒为单链RNA病毒(ssRNA病毒)。在一些实施例中,ssRNA病毒为正义单链RNA病毒(+ssRNA病毒)。在一些实施例中,(+)ssRNA病毒为冠状病毒。在一些实施例中,冠状病毒为 $\beta$ -冠状病毒。在一些实施例中, $\beta$ -冠状病毒选自以下项组成的组:严重急性呼吸综合征冠状病毒2(SARS-CoV-2)(也被称为临时名称2019新型冠状病毒或2019-nCoV)、人冠状病毒OC43(hCoV-OC43)、中东呼吸综合征相关冠状病毒(MERS-CoV,也被称为临时名称2012新型冠状病毒或2012-nCoV)和严重急性呼吸道综合征相关冠状病毒(SARS-CoV,也被称为SARS-CoV-1)。在一些实施例中, $\beta$ -冠状病毒为SARS-CoV-2,即COVID-19的病原体。一些示例性靶基因示出在说明书的末尾处的表6中。

[0141] 在一些实施例中,靶RNA序列选自HBV的S基因或X基因。在一些实施例中,HBV具有SEQ ID NO:90的核苷酸序列所示的基因组序列,其对应于GenBank登录号U95551.1的核苷酸序列,其以引用方式整体并入本文。

[0142] 示例性HBV基因组序列示于SEQ ID NO:89中,对应于Genbank登录号KC315400.1,其以引用方式整体并入本文。SEQ ID NO:89的核苷酸2307..3215,1..1623对应于针对聚合酶蛋白编码的聚合酶/RT基因序列。SEQ ID NO:89的核苷酸2848..3215,1..835对应于PreS1/S2/S基因序列,其编码大S蛋白。SEQ ID NO:89的核苷酸3205..3215,1..835对应于PreS2/S基因序列,其编码中间S蛋白。SEQ ID NO:89的核苷酸155..835对应于S基因序列,其编码小S蛋白。SEQ ID NO:89的核苷酸1374..1838对应于X基因序列,其编码X蛋白。SEQ ID NO:89的核苷酸1814..2452对应于PreC/C基因序列,其编码前核心/核心蛋白。SEQ ID NO:89的核苷酸1901..2452对应于C基因序列,其编码核心蛋白。HBV基因组进一步包含病毒调控元件,诸如病毒启动子(preS2、preS1、Core和X)和增强子元件(ENH1和ENH2)。SEQ ID NO:89的核苷酸1624..1771对应于ENH2。SEQ ID NO:60的核苷酸1742..1849对应于核心启动子。SEQ ID NO:89的核苷酸1818...3215,1..1930对应于前基因组RNA(pgRNA),其编码核心蛋白和聚合酶蛋白。

[0143] 在一些实施例中,靶RNA序列选自SARS-CoV的基因组。在一些实施例中,SARS-CoV具有对应于GenBank登录号NC\_004718.3的核苷酸序列的基因组,其以引用方式整体并入本

文。

[0144] 在一些实施例中,靶RNA序列选自MERS-CoV的基因组。在一些实施例中,MERS-CoV具有对应于GenBank登录号NC\_019843.3的核苷酸序列的基因组,其以引用方式整体并入本文。

[0145] 在一些实施例中,靶RNA序列选自hCoV-OC43的基因组。在一些实施例中,hCoV-OC43具有对应于GenBank登录号NC\_006213.1的核苷酸序列的基因组,其以引用方式整体并入本文。

[0146] 在一些实施例中,靶RNA序列选自SARS-CoV-2的基因组。在一些实施例中,SARS-CoV-2具有对应于GenBank登录号NC\_045512.2的核苷酸序列的基因组序列,其以引用方式整体并入本文。

[0147] 在一些实施例中,靶RNA序列可以是任何羟基类固醇脱氢酶基因。在任何实施例中,基因为羟基类固醇17- $\beta$ 脱氢酶13(HSD17B13)。HSD17B13具有SEQ ID NO:91的核苷酸序列所示的序列,其对应于GenBank登录号NM\_178135.5的编码序列的核苷酸序列(核苷酸42至944),其以引用方式整体并入本文。

[0148] 在一些实施例中,靶RNA序列与SEQ ID NO:91内的核苷酸区至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%相同,不同的是SEQ ID NO:91中的胸腺嘧啶(T)被尿嘧啶(U)替代。在一些实施例中,第一核苷酸序列与SEQ ID NO:91内的15至30、15至25、15至23、15至22、15至21、17至25、17至23、17至22、17至21或19至21个核苷酸至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%相同。

[0149] 在一些实施例中,靶RNA序列参与肝代谢。在一些实施例中,靶RNA序列为电子传递链的抑制剂。在一些实施例中,靶基因编码MCJ蛋白(MCJ/DnaJC15或甲基化控制的J蛋白)。在一些实施例中,MCJ蛋白由SEQ ID NO:92的mRNA序列编码,其对应于GenBank登录号NM\_013238.3的核苷酸序列,其以引用方式整体并入本文。

[0150] 在一些实施例中,靶RNA序列为TAZ。在一些实施例中,TAZ包含SEQ ID NO:93的核苷酸序列,其对应于GenBank登录号NM\_000116.5的核苷酸序列,其以引用方式整体并入本文。

[0151] 在一些实施例中,靶RNA序列为血管生成素样3(ANGPTL3)。在一些实施例中,ANGPTL3包含SEQ ID NO:94的核苷酸序列,其对应于GenBank登录号NM\_014495.4的核苷酸序列,其以引用方式整体并入本文。

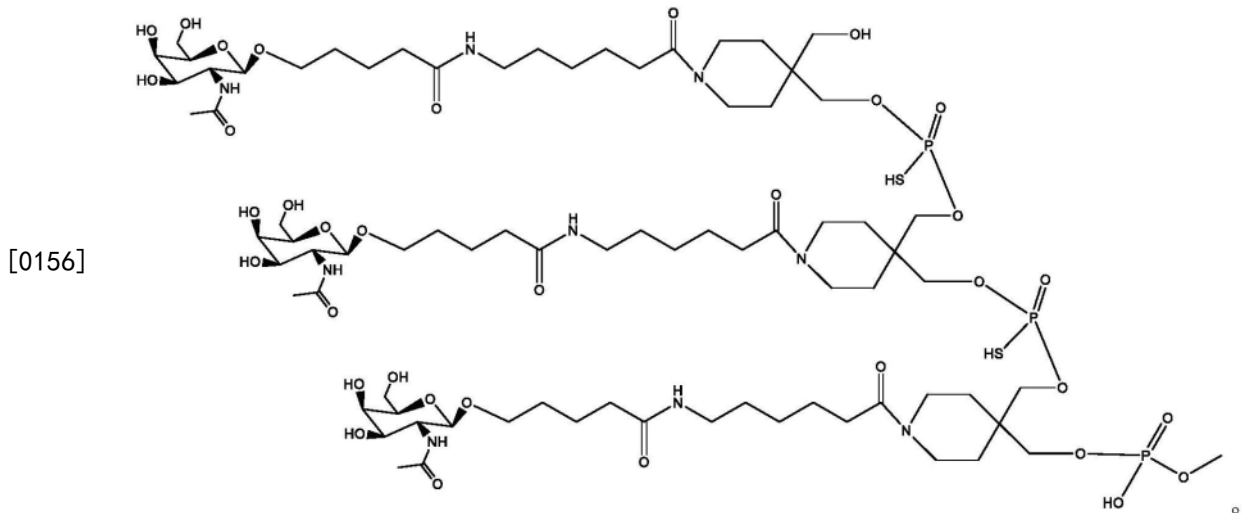
[0152] 在一些实施例中,靶RNA序列为二酰基甘油酰基转移酶2(DGAT2)。在一些实施例中,DGAT2包含SEQ ID NO:95的核苷酸序列,其对应于GenBank登录号NM\_001253891.1的核苷酸序列,其以引用方式整体并入本文。

[0153] 缀合部分

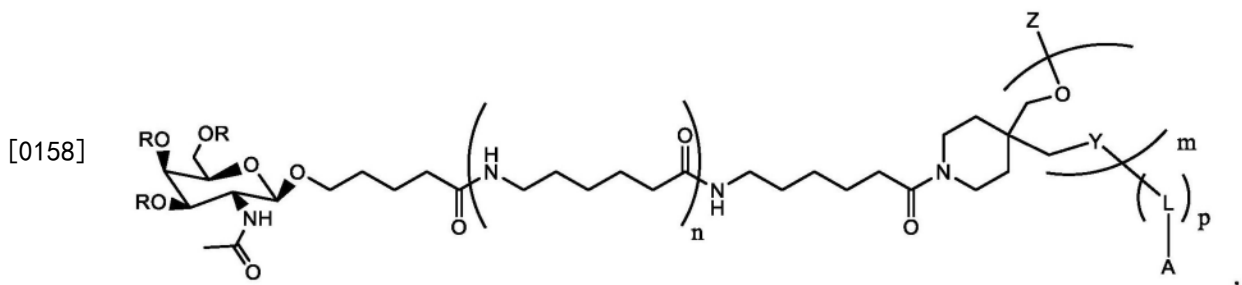
[0154] 本公开还涉及与缀合到ASO的另外的部件,诸如靶向部分和在一个或多个端部处经修饰的寡核苷酸。在一些实施例中,缀合部分选自半乳糖胺、肽、蛋白质、甾醇、脂质、磷脂、生物素、吩噻嗪、活性药物物质、胆固醇、菲啶、葱醌、吡啶、荧光素、罗丹明、香豆素、叶酸和染料。

[0155] 在一些实施例中,靶向部分可包含碳水化合物,诸如单糖,例如N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)、二糖、三糖、四糖、寡糖和多糖。在一些实施例中,靶向部分通过一种或多种接头

任选地以连续结构附接至ASO的一种或多种GalNAc衍生物,诸如两种或三种GalNAc衍生物。在某些实施例中,靶向部分包含通过接头附接的三个连续的GalNAc部分,诸如:

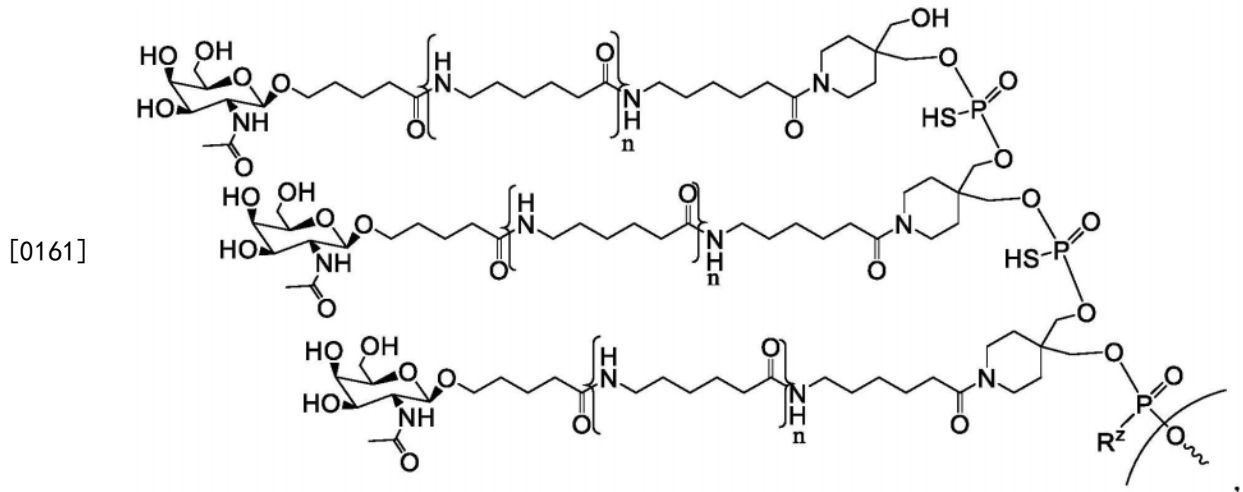


[0157] 在一些实施例中,缀合部分为半乳糖胺。在一些实施例中,本文所公开的ASO中的任一种附接至作为半乳糖胺的缀合部分。在一些实施例中,半乳糖胺为N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)。在一些实施例中,本文所公开的ASO中任一种包含GalNAc。在一些实施例中,GalNAc为式(VI):



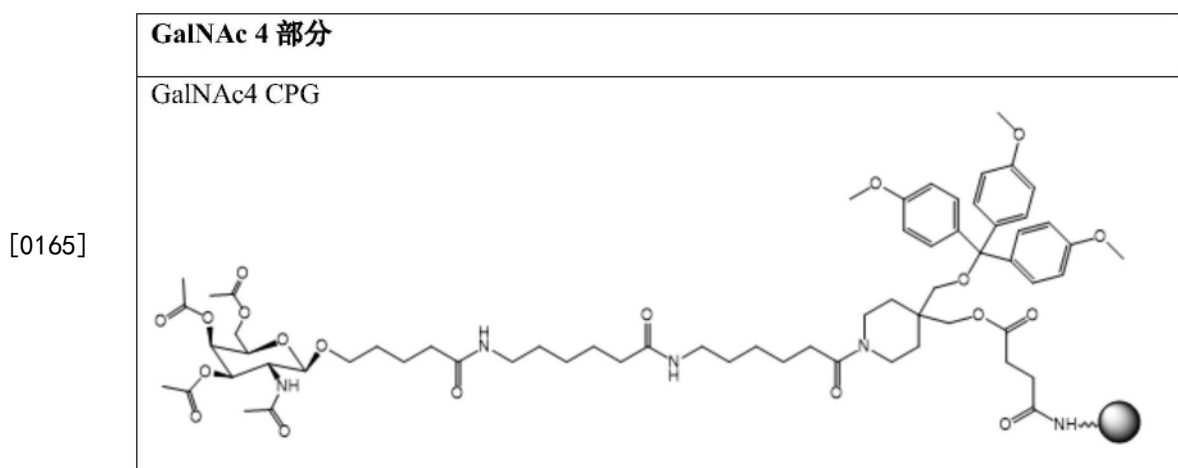
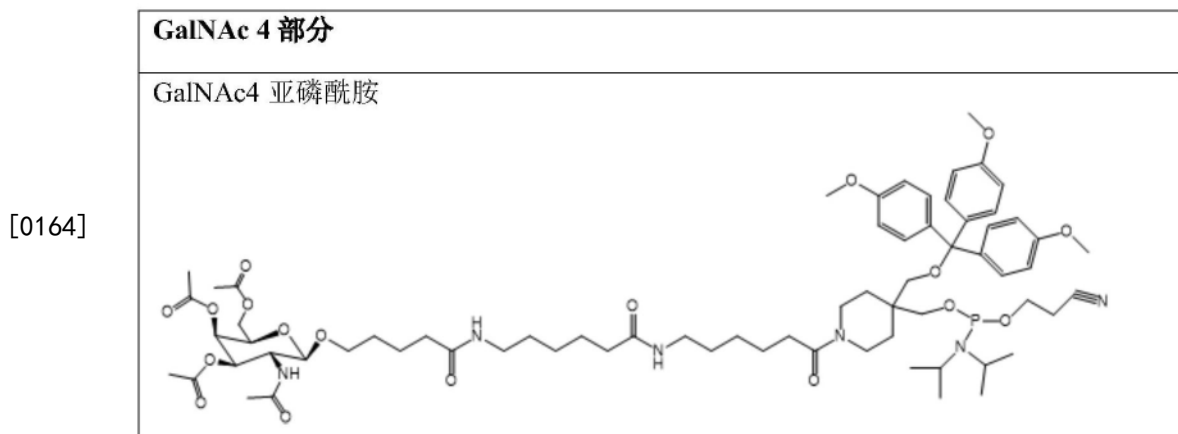
[0159] 其中m为1、2、3、4或5;每个n独立地为1或2;p为0或1;每个R独立地为H或第一保护基团;每个Y独立地选自-O-P(=O)(SH)-、-O-P(=O)(O)-、-O-P(=O)(OH)-、-O-P(S)S-和-O-;Z为H或第二保护基团;L为接头或者L和Y组合地为接头;并且A为H、OH、第三保护基团、活化基团或寡核苷酸。在一些实施例中,第一保护基团为乙酰基。在一些实施例中,第二保护基团为三甲氧基三苯甲基(TMT)。在一些实施例中,活化基团为亚磷酰胺基团。在一些实施例中,亚磷酰胺基团为氰基乙氧基N,N-二异丙基亚磷酰胺基团。在一些实施例中,接头为C6-NH<sub>2</sub>基团。在一些实施例中,A为ASO。在一些实施例中,R为H,Z为H,并且n为1。在一些实施例中,R为H,Z为H,并且n为2。

[0160] 在一些实施例中,GalNAc为式(VII):



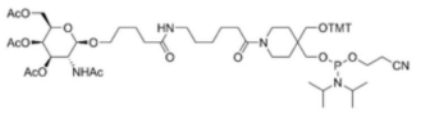
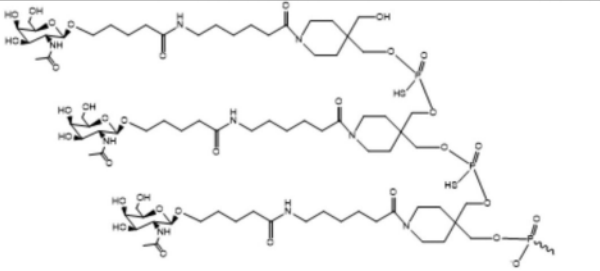
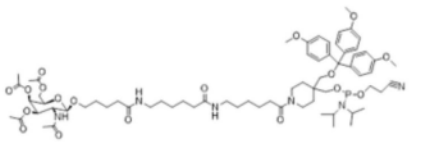
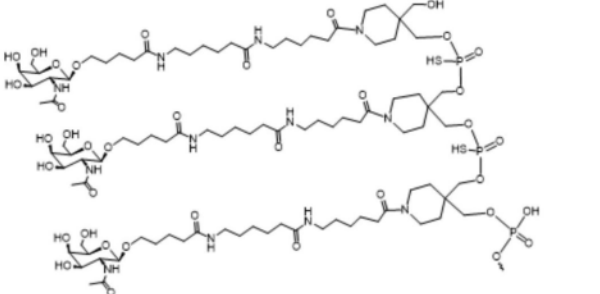
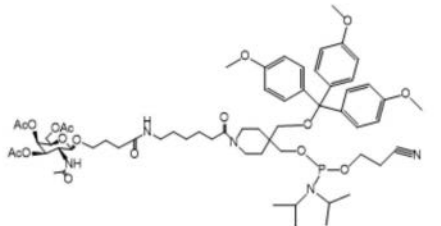
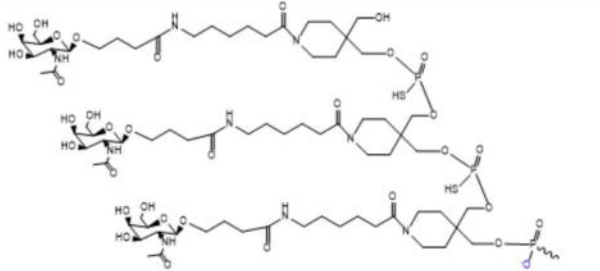
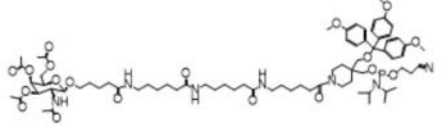
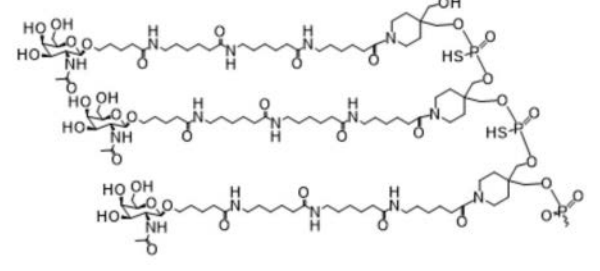
[0162] 其中 $R^2$ 为OH或SH;并且每个n独立地为1或2。在一些实施例中,靶向配体可以是GalNAc靶向配体,其可包含1、2、3、4、5或6个GalNAc单元。在一些实施例中,靶向配体可以是选自GalNAc2、GalNAc3、GalNAc4、GalNAc5和GalNAc6的GalNAc。

[0163] 在一些实施例中,GalNAc可以是GalNAc酰胺、GalNAc 4CPG、GalNAc亚磷酰胺或GalNAc4-ps-GalNAc4-ps-GalNAc4。这些GalNAc部分如下所示:



[0166] GalNAc3、GalNAc4、GalNAc5和GalNAc6可以在合成期间用1、2或3个部分缀合到本文所公开的ASO。其他GalNAc部分,诸如GalNAc1和GalNAc2,可用于使用合成后缀合形成5'和3'-GalNAc。

[0167] GalNAc亚磷酰胺

GalNAc 结构单元	附接到寡核苷酸后 (命名法)
<p>GalNAc-3 亚磷酰胺</p> 	 <p>(GalNAc3-(PS)2-p)</p>
<p>GalNAc-4 亚磷酰胺</p> 	 <p>(GalNAc4-(PS)2-p)</p>
<p>GalNAc-5 亚磷酰胺</p> 	 <p>(GalNAc5-(PS)2-p)</p>
<p>GalNAc-6 亚磷酰胺</p> 	 <p>(GalNAc6-(PS)2-p)</p>

[0170] 在一些实施例中,ASO在ASO的5'端、3'端或两端含有靶向部分。缀合部分可以经由1、2、3、4或5个或更多个接头附接至ASO。在一些实施例中,该一个或多个接头独立地选自以下项组成的组:磷酸二酯(p或po)接头、硫代磷酸酯(ps)接头、甲磺酰基磷酸酰胺接头

(yp)、亚磷酰胺(HEG)接头、三甘醇(TEG)接头和/或二硫代磷酸酯接头。在一些实施例中,该一个或多个接头独立地选自以下项组成的组:p-(PS)2、(PS)2-p-TEG-p、(PS)2-p-HEG-p和(PS)2-p-(HEG-p)2。

[0171] 在一些实施例中,缀合部分为脂质部分。在一些实施例中,本文所公开的ASO中的任一种附接至作为脂质部分的缀合部分。脂质部分的实例包括但不限于胆固醇部分、硫醚(例如己基-S-三苯甲基硫醇)、硫代胆固醇、脂族链(例如十二烷基二醇或十一烷基残基)、磷脂(例如,二-十六基-rac-甘油或1-二-0-十六基-rac-三丙基-S-H-磷酸三乙基铵)、聚胺或聚乙二醇链、金刚烷乙酸、棕榈基部分或十八烷基胺或己基氨基-羰基-羟胆固醇部分。

[0172] 在一些实施例中,缀合部分为活性药物物质。在一些实施例中,本文所公开的ASO中的任一种附接至作为活性药物物质的缀合部分。活性药物物质的实例包括但不限于阿司匹林、华法林、苯基丁氮酮、布洛芬、舒洛芬、芬布芬、酮洛芬、(5)-(+) -普拉洛芬、卡洛芬、丹磺酰肌氨酸(dansylsarcosine)、2,3,5-三碘苯甲酸、氟芬那酸、亚叶酸、苯并噻二嗪、氯噻嗪、二氮杂卓、吡啶美辛、巴比妥酸盐、头孢菌素、磺胺类药、抗糖尿病药、抗菌药或抗生素。

[0173] 示例性ASO

[0174] 如上所述,本文所公开的ASO可以包含经修饰的核苷酸,诸如Gutb、Nmln、5prnl、G-夹或它们的组合。另外地或替代性地,本文所公开的ASO可以包含至少一个甲磺酰基磷酸酯核苷间键。表1提供了一些示例性ASO,其包含经修饰的核苷酸,诸如Gutb、Nmln、5prnl、G-夹或它们的组合;至少一个甲磺酰基磷酸酯核苷间键合(在序列中称为“yp”);或它们的组合。

[0175] 表1-示例性ASO序列

[0176]

SEQ ID NO.	ASO #	序列 (5'至 3')
1	1	InGpslnApslnTpslnApslnAypApsAps(5oh)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsep(5m)C
2	2	InGpslnApslnTpslnApslnAypAypAps(5oh)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsep(5m)C
3	3	InGpslnApslnTpslnApslnAypAypAyp(5oh)CypGyp(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsep(5m)C
4	4	InGpslnApslnTpslnApslnAypApsAps(5oh)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
5	5	InGpslnApslnTpslnApslnAypAypAps(5oh)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
6	6	InGpslnApslnTpslnApslnAypAypAyp(5oh)CypGyp(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
7	7	InGpslnApslnTps(Nmln)ApslnAypApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
8	8	InGpslnApslnTps(Nmln)ApslnAypAypAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
9	9	InGpslnApslnTps(Nmln)ApslnAypAypAyp(5m)CypGyp(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
10	10	InGpslnApslnTps(Nmln)ApslnAypAypAyp(5m)CypGyp(5m)Cyp(5m)CypGyp(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
11	11	InGpslnApslnTpslnApslnAypAypAyp(5oh)CypGyp(5m)Cyp(5m)CypGyp(5m)CyplnApslnGpslnApsep(5m)C
12	12	InGpslnApslnTpslnApslnAypApsAyp(5oh)CpsGyp(5m)Cps(5m)CypGps(5m)CyplnApslnGpslnApsep(5m)C
13	13	InGypInAypInTyplnAypInAypApsAps(5oh)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnAypInGypInAypcp(5m)C
14	14	InGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5oh)CypGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsep(5m)C
15	15	InGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5oh)CpsGps(5m)Cyp(5m)CypGps(5m)CpslnApslnGpslnApsep(5m)C
16	16	InGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5oh)CpsGps(5m)Cps(5m)CypGyp(5m)CpslnApslnGpslnApsep(5m)C
17	17	InGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5oh)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGyp(5m)CyplnApslnGpslnApsep(5m)C
18	18	InGpslnApsScTypdTps(5m)Cps(8Am)ApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG
19	19	InGpslnApsScTypdTyp(5m)Cps(8Am)ApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG
20	20	InGpslnApsScTypdTyp(5m)Cyp(8Am)AypGyp(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG

[0177]

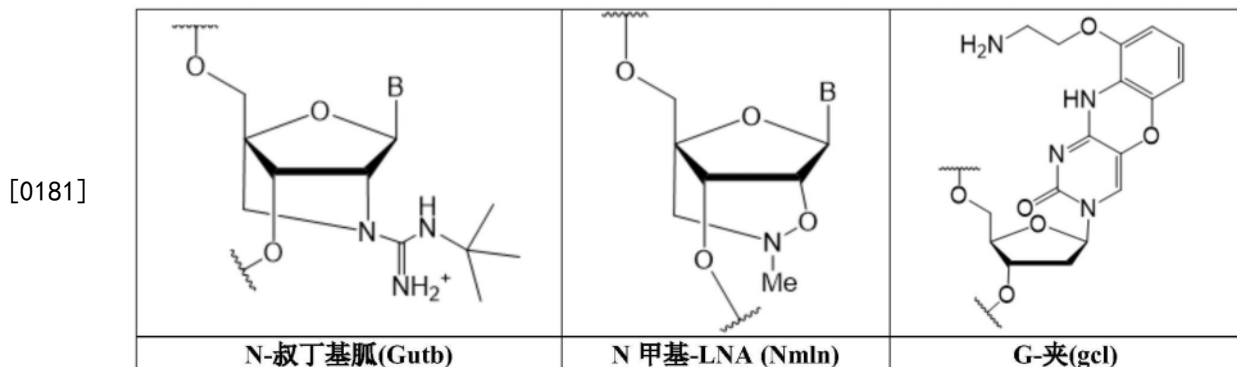
SEQ ID NO.	ASO #	序列 (5'至 3')
21	21	InGpslnApsScTypdTyp(5m)Cyp(8Am)AypGyp(5m)CypGyp(5m)Cyp(5m)CypGypApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG
22	22	InGpslnApsScTypdTps(5m)Cyp(8Am)ApsGyp(5m)CpsGyp(5m)Cps(5m)CypGpsAypIn(5m)CpslnGpslnGpslnG
23	23	GalNac4-ps2-p-mA-InGpslnApslnTpslnApslnAypAypAyp(5oh)CypGyp(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApscp(5m)C
24	24	GalNac4-ps2-p-mA-InGpslnApslnTpslnApslnAypAypAyp(5oh)CypGyp(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
25	25	InGpslnApslnTpsTps(gcl)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG
26	26	InGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(gcl)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG
27	27	InGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(gcl)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG
28	28	InGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(gcl)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG
29	29	InGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsAps(gcl)CpslnGpslnGpslnG
30	30	InGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(gcl)CpsGpsAps(gcl)CpslnGpslnGpslnG
31	31	InGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(gcl)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
32	32	InGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(gcl)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
33	33	InGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(gcl)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
34	34	InGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(gcl)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
35	35	InGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnAps(gcl)C
36	36	InGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(gcl)CpslnApslnGpslnAps(gcl)C
37	37	InGpslnApslnTpsTps(5prnl)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG
38	38	InGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5prnl)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG
39	39	InGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5prnl)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG
40	40	InGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5prnl)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG
41	41	InGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5prnl)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
42	42	InGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5prnl)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
43	43	InGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5prnl)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
44	44	InGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5prnl)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
45	45	InGps(gutb)ApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
46	46	InGpslnAps(gutb)TpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
47	47	InGpslnApslnTps(gutb)ApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C

[0178]

SEQ ID NO.	ASO #	序列 (5'至 3')
48	48	InGpsInApsInTpsInAps( <b>gutb</b> )ApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpsInApsInGpsInApsIn(5m)C
49	49	InGpsInApsInTpsInApsInApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)Cps( <b>gutb</b> )ApsInGpsInApsIn(5m)C
50	50	InGpsInApsInTpsInApsInApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpsInApsInGps( <b>gutb</b> )ApsIn(5m)C
51	51	InGpsInApsInTpsInApsInApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpsInApsInGpsInAps( <b>gutb</b> )(5m)C
52	52	InGps( <b>gutb</b> )ApsInTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsIn(5m)CpsInGpsInGpsInG
53	53	InGpsInAps( <b>gutb</b> )TpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsIn(5m)CpsInGpsInGpsInG
54	54	InGpsInApsInTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsAps( <b>gutb</b> )(5m)CpsInGpsInGpsInG
55	55	GalNac4-ps2-p-mA-InGps( <b>gutb</b> )ApsInTpsInApsInApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpsInApsInGpsInApsIn(5m)C
56	56	GalNac4-ps2-p-mA-InGps( <b>gutb</b> )ApsInTpsInApsInApsApsAps(5oh)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpsInApsInGpsInApsIn(5m)C
57	57	GalNac4-ps2-p-mA-InGps( <b>gutb</b> )ApsInTpsInApsInApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpsInApsInGpsInApscp(5m)C
58	58	GalNac4-ps2-p-mA-InGps( <b>gutb</b> )ApsInTpsInApsInApsApsAps(5oh)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpsInApsInGpsInApscp(5m)C
59	59	GalNac4-ps2-p-mA-InGpsInApsInTpsInApsInApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpsInApsInGpsInApsIn(5m)C
60	60	GalNac4-ps2-p-mA-InGpsInAps( <b>gutb</b> )TpsInApsInApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpsInApsInGpsInApsIn(5m)C
61	61	GalNac4-ps2-p-mA-InGpsInAps( <b>gutb</b> )TpsInApsInApsApsAps(5oh)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpsInApsInGpsInApsIn(5m)C
62	62	GalNac4-ps2-p-mA-InGpsInAps( <b>gutb</b> )TpsInApsInApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpsInApsInGpsInApscp(5m)C
63	63	GalNac4-ps2-p-mA-InGpsInAps( <b>gutb</b> )TpsInApsInApsApsAps(5oh)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpsInApsInGpsInApscp(5m)C
64	64	InGpsInApsInTpsInApsInApsApsAps(5oh)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpsInApsInGpsInApscp(5m)C
65	65	InGpsInApsInTpsInApsInApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpsInApsInGpsInApsIn(5m)C
66	66	( <b>Nmln</b> )AGpsInApsInTpsInApsInApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpsInApsInGpsInApsIn(5m)C
67	67	InGps( <b>Nmln</b> )ApsInTpsInApsInApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpsInApsInGpsInApsIn(5m)C
68	68	InGpsInAps( <b>Nmln</b> )TpsInApsInApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpsInApsInGpsInApsIn(5m)C
69	69	InGpsInApsInTps( <b>Nmln</b> )ApsInApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpsInApsInGpsInApsIn(5m)C
70	70	InGpsInApsInTpsInAps( <b>Nmln</b> )ApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpsInApsInGpsInApsIn(5m)C
71	71	InGpsInApsInTpsInApsInApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)Cps

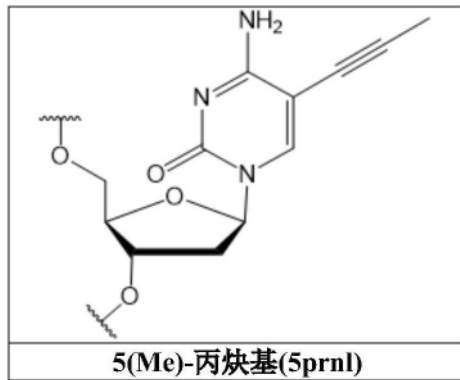
SEQ ID NO.	ASO #	序列 (5'至 3')
		(Nmln)ApslnGpslnApsln(5m)C
72	72	lnGpslnApslnTpslnApslnApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnAps(Nmln)GpslnApsln(5m)C
73	73	lnGpslnApslnTpslnApslnApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGps(Nmln)Apsln(5m)C
74	74	lnGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnAps(Nmln)(5m)C
75	75	lnGpslnApscpTpsTps(5m)Cps(8nh)ApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG
76	76	lnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG
77	77	(Nmln)GpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG
78	78	lnGps(Nmln)ApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG
79	79	lnGpslnAps(Nmln)TpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG
[0179] 80	80	lnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnGps(Nmln)G
81	81	lnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGps(Nmln)GpslnG
82	82	lnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)Cps(Nmln)GpslnGpslnG
83	83	lnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsAps(Nmln)(5m)CpslnGpslnGpslnG
84	84	GalNAc4-ps2-p-mA-lnGpslnApslnTps(Nmln)ApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
85	85	GalNAc4-ps2-p-mA-lnGpslnApslnTps(Nmln)ApslnApsApsAps(5OH)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
86	86	GalNAc4-ps2-p-mA-lnGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
87	87	GalNAc4-ps2-p-mA-lnGpslnApslnTps(Nmln)ApslnApsApsAps(5OH)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApscp(5m)C-3'
88	88	lnGypInAyplnTyplnAyplnAypApsAps(5oh)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CypInAyplnGypInAyplnAypcp(5m)C

[0180] 在表1中,粗体核苷含有以下修饰中的一种:



[0181]

[0182]



[0183] 药物组合物

[0184] 本公开还涵盖包含本公开的ASO的药物组合物。一个实施例是一种药物组合物,其包含本公开的一种或多种ASO以及药学上可接受的稀释剂或载体。

[0185] 在一些实施例中,含有本公开的ASO的药物组合物被配制用于经由肠胃外递送进行全身施用。肠胃外施用包括静脉内、动脉内、皮下、腹膜内或肌内注射或输注;也可皮下施用,例如经由植入装置。在优选的实施例中,含有本公开的ASO的药物组合物被配制用于皮下(SC)或静脉内(IV)递送。用于肠胃外施用的制剂可以包含无菌水溶液,其还可以含有缓冲剂、稀释剂以及本领域技术人员理解的其他药学上可接受的添加剂。对于静脉内使用,可以控制溶质的总浓度以使制剂等渗。

[0186] 含有本公开的ASO的药物组合物可用于治疗例如与HBV基因的表达或活性相关的疾病或疾患。

[0187] 在一些实施例中,药物组合物包含与HBV的第一X区中的病毒靶RNA序列互补或杂交的本公开的第一ASO,以及与HBV的第二X区或S区中的病毒靶RNA序列互补或杂交的本公开的第二ASO,以及药学上可接受的稀释剂或载体。当药物组合物包含两种或更多种ASO时,ASO可以以不同的量存在。例如,在一些实施例中,第一ASO与第二ASO的重量比为1:4至4:1,例如1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1或4:1。在一些实施例中,第一ASO与第二ASO的摩尔比为1:4至4:1,例如1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1或4:1。

[0188] 治疗

[0189] 本文所述的siNA分子和组合物可以施用于受试者以治疗疾病。本文进一步公开了本文所公开的siNA分子或组合物中的任一者在制造用于治疗疾病的药物中的用途。具体地,本公开提供了用于治疗各种疾病的ASO,诸如传染病,包括但不限于病毒性疾病和肝病。

[0190] 本公开的一方面包括用于治疗被诊断患有、疑似患有HBV感染和/或HBV相关病症或处于患有HBV感染和/或HBV相关疾患的风险中的受试者的方法。在治疗应用中,将包含至少一种所公开的ASO的组合物施用于疑似或已经患有此类疾病(诸如,例如,HBV cccDNA的持续存在、HBV抗原(例如,HBsAg和/或HBeAg)的存在的受试者,在受试者的血清和/或肝中,或升高的HBV病毒载量水平),其量足以治愈或至少部分阻止疾病,包括其并发症和疾病的发展中的中间病理表型。

[0191] 患有HBV感染和/或HBV相关疾患的受试者可以通过本领域已知的诊断或预后测定中的任一种或其组合来鉴定。例如,HBV感染和/或HBV相关疾患的典型症状包括但不限于肝HBV cccDNA的存在、血清和/或肝HBV抗原(例如,HBsAg和/或HBeAg)的存在,ALT升高、AST升高、抗HBV抗体缺乏或水平低、肝损伤、肝硬化、丁型肝炎、急性乙型肝炎、急性暴发性乙型肝炎

炎、慢性乙型肝炎、肝纤维化、终末期肝病、肝细胞癌、血清病样综合征、厌食、恶心、呕吐、低烧、肌痛、易疲劳、味觉敏度和嗅觉紊乱(厌恶食物和香烟)、右上腹和上腹疼痛(间歇性、轻度至中度)、肝性脑病、嗜睡、睡眠模式的紊乱、精神错乱、昏迷、腹水、胃肠道出血、凝血障碍、黄疸、肝肿大(轻度肿大、肝软)、脾肿大、掌红斑、蜘蛛痣、肌肉萎缩、蜘蛛状血管瘤、血管炎、静脉曲张出血、周围水肿、男性乳房发育、睾丸萎缩、腹部侧支静脉(水母头)、高水平的丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)(在1000-2000IU/mL的范围内)、ALT水平高于AST水平、 $\gamma$ -谷氨酰转肽酶(GGT)和/或碱性磷酸酶(ALP)水平升高、白蛋白水平降低、血清铁水平升高、白细胞减少(即,粒细胞减少)、淋巴细胞增多、红细胞沉降率(ESR)增加、红血细胞存活期缩短、溶血、血小板减少、国际标准化比值(INR)的延长、血清HBV DNA的存在、转氨酶升高(<ULN 5倍)、胆红素水平升高、凝血酶原时间(PT)延长、高球蛋白血症、组织非特异性抗体(诸如抗平滑肌抗体(ASMA)或抗核抗体(ANA))的存在、组织特异性抗体(诸如针对甲状腺的抗体)的存在,类风湿因子(RF)的水平升高,高胆红素血症,血小板和白血细胞计数低,AST水平高于ALT水平,小叶炎症伴有退行性和再生性肝细胞变化,并且主要是小叶中心坏死。

[0192] 在一些实施例中,用所公开的ASO治疗的受试者将表现出以下一种或多种病症或症状的改善或消除:肝HBV cccDNA的存在、血清和/或肝HBV抗原(例如,HBsAg和/或HBeAg)的存在、抗HBV抗体缺乏或水平低、肝损伤、肝硬化、丁型肝炎、急性乙型肝炎、急性暴发性乙型肝炎、慢性乙型肝炎、肝纤维化、终末期肝病、肝细胞癌、血清病样综合征、厌食、恶心、呕吐、低烧、肌痛、易疲劳、味觉敏度和嗅觉紊乱(厌恶食物和香烟)、右上腹和上腹疼痛(间歇性、轻度至中度)、肝性脑病、嗜睡、睡眠模式的紊乱、精神错乱、昏迷、腹水、胃肠道出血、凝血障碍、黄疸、肝肿大(轻度肿大、肝软)、脾肿大、掌红斑、蜘蛛痣、肌肉萎缩、蜘蛛状血管瘤、血管炎、静脉曲张出血、周围水肿、男性乳房发育症、睾丸萎缩、腹部侧支静脉(头水母)、ALT水平高于AST水平、白细胞减少(即粒细胞减少)、白蛋白水平降低、血清铁水平升高、淋巴细胞增多、红细胞沉降率(ESR)增加、红血细胞缩短生存、溶血、血小板减少、国际标准化比值(INR)的延长、血清HBV DNA的存在、凝血酶原时间(PT)延长、高球蛋白血症、组织非特异性抗体(诸如抗平滑肌抗体(ASMA)或抗核抗体(ANA))的存在、组织特异性抗体(诸如抗甲状腺抗体)的存在、高胆红素血症、血小板和白血细胞计数低、AST水平高于ALT水平、小叶炎症伴有退行性和再生性肝细胞变化,并且主要是小叶中心坏死。

[0193] 本公开提供了用于治疗被诊断患有或疑似患有HBV感染和/或HBV相关疾患的受试者的方法,包括向受试者施用有效量的本公开的ASO组合物。在一些实施例中,该方法包括向受试者施用本公开的第一ASO和本公开的第二ASO,其中第一ASO与HBV的第一X区中的病毒靶RNA序列互补或杂交,并且第二ASO与HBV的第二X区或S区中的病毒靶RNA序列互补或杂交。在一些实施例中,第二ASO与HBV的第二X区中的病毒靶RNA序列互补或杂交。在其他实施例中,第二ASO与HBV的S区中的病毒靶RNA序列互补或杂交。

[0194] 在所公开的方法和用途的一些实施例中,该疾病为呼吸道疾病。在一些实施例中,呼吸道疾病为病毒性感染。在一些实施例中,呼吸道疾病为病毒性肺炎。在一些实施例中,呼吸道疾病为急性呼吸道感染。在一些实施例中,呼吸道疾病为感冒。在一些实施例中,呼吸道疾病为严重急性呼吸综合征(SARS)。在一些实施例中,呼吸道疾病为中东呼吸综合征(MERS)。在一些实施例中,该疾病为2019年冠状病毒疾病(例如,COVID-19)。在一些实施例

中,呼吸道疾病可包括选自以下的一种或多种症状:咳嗽、喉咙痛、流鼻涕、打喷嚏、头痛、发烧、呼吸短促、肌痛、腹痛、疲劳、呼吸困难、持续性胸部疼痛或压迫感、困难醒来、嗅觉和味觉丧失、肌肉或关节疼痛、发冷、恶心或呕吐、鼻塞、腹泻、咯血、结膜充血、咳痰、胸闷和心悸。在一些实施例中,呼吸道疾病可包括选自鼻窦炎、中耳炎、肺炎、急性呼吸窘迫综合征、弥散性血管内凝血、心包炎和肾衰竭的并发症。在一些实施例中,呼吸道疾病是特发性的。

[0195] 在一些实施例中,本公开提供了治疗或预防冠状病毒感染的方法,包括向有此需要的受试者施用治疗有效量的一种或多种本文所公开的ASO或药物组合物。在一些实施例中,冠状病毒感染选自由以下项组成的组:中东呼吸综合征(MERS)、严重急性呼吸道综合征(SARS)和COVID-19。在一些实施例中,受试者已经用一种或多种额外冠状病毒治疗剂治疗。在一些实施例中,受试者同时用一种或多种额外冠状病毒治疗剂治疗。

[0196] 在一些实施例中,该疾病为肝病。在一些实施例中,肝病为非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)。在一些实施例中,NAFLD为非酒精性脂肪性肝炎(NASH)。在一些实施例中,肝病为肝细胞癌(HCC)。

[0197] 本公开的ASO可用于治疗有此需要的受试者的疾病。在一些实施例中,治疗有此需要的受试者中的疾病的方法包括向受试者施用本文所公开的ASO中的任一种。在一些实施例中,治疗有此需要的受试者中的疾病的方法包括向受试者施用本文所公开的组合物中的任一种。

[0198] ASO的施用可以通过本领域已知的方法进行。在一些实施例中,ASO通过皮下(SC)或静脉内(IV)递送来施用。本公开的制剂(例如,ASO或组合物)可以口服、肠胃外、局部或直肠给予。当然,它们以适合每种施用途径的形式给予。例如,它们以片剂或胶囊形式施用,通过注射、输注或吸入施用;局部通过洗剂或软膏;以及直肠通过栓剂。在一些实施例中,皮下施用是优选的。

[0199] 本文所用的短语“肠胃外施用(parenteral administration)”和“经肠胃外施用(administered parenterally)”是指除了肠内和局部施用以外的其他施用方式(通常通过注射进行施用),并且包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、气管内、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内和胸骨内注射和输注。

[0200] 本文所用的短语“全身施用(systemic administration)”、“全身地施用(administered systemically)”、“外周施用(peripheral administration)”和“外周地施用(administered peripherally)”是指将化合物、药物或其他材料施用而不是直接施用到中枢神经系统中,使得其进入患者的系统,因此受制于代谢和其他类似过程,例如皮下施用。

[0201] 这些化合物可以通过任何合适的施用途径施用于人和其他动物以进行疗法,包括口服、经鼻(例如通过喷雾剂)、直肠、阴道内、肠胃外、脑池内和局部(如通过粉剂、软膏或滴剂),包括含服和舌下。

[0202] 无论选择何种施用途径,可以以合适的水合形式使用的本公开的化合物(例如,ASO)和/或本公开的药物组合物通过本领域技术人员已知的常规方法配制成药学上可接受的剂型。

[0203] 本公开的药物组合物中活性成分的实际剂量水平可以变化,以获得有效实现针对特定患者、组合物和施用方式的期望治疗响应而不会对患者产生毒性的活性成分的量。

[0204] 所选择的剂量水平将取决于多种因素,包括所使用的本公开的特定化合物(例如,ASO)或者其酯、盐或酰胺的活性、施用的途径、施用的时间、所使用的特定化合物的排泄或代谢的速率、吸收的速率和程度、治疗的持续时间、与所使用的特定化合物组合地使用的其他药物、化合物和/或材料、所治疗的患者的年龄、性别、体重、病状、总体健康状况和既往病史以及医学领域公知的类似因素。

[0205] 具有本领域普通技术的医师或兽医可以容易地确定和开出所需药物组合物的有效量。例如,医生或兽医可以以低于实现期望的治疗效果所需水平的水平开始药物组合物中所用的本公开的化合物(例如,ASO)的剂量,并逐渐增加剂量直至实现期望的效果。

[0206] 一般而言,本公开的化合物(例如,ASO)的合适日剂量是有效产生治疗效果的最低剂量的化合物的量。此类有效剂量通常取决于上述因素。优选地,化合物以约0.01mg/kg至约200mg/kg、更优选地以约0.1mg/kg至约100mg/kg、甚至更优选地以约0.5mg/kg至约50mg/kg施用。在一些实施例中,化合物以约1mg/kg至约40mg/kg、约1mg/kg至约30mg/kg、约1mg/kg至约20mg/kg、约1mg/kg至约15mg/kg,或1mg/kg至约10mg/kg施用。在一些实施例中,化合物以等于或大于0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.10、0.11、0.12、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.18、0.19、0.20、0.21、0.22、0.23、0.24、0.25、0.26、0.27、0.28、0.29、0.30、0.35、0.40、0.45、0.50、0.55、0.60、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、0.95或1mg/kg的剂量施用。在一些实施例中,化合物以等于或大于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30mg/kg的剂量施用。在一些实施例中,化合物以等于或小于200、190、180、170、160、150、140、130、120、110、100、95、90、85、80、75、70、65、60、55、50、45、40、35、30、25、20或15mg/kg的剂量施用。在一些实施例中,化合物的总日剂量等于或大于10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195或100mg。

[0207] 如果需要,活性化合物(例如,ASO)的有效日剂量可以作为两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次、十次或更多次剂量或亚剂量在全天中以适当的时间间隔分开施用,任选地以单位剂型施用。在一些实施例中,至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15次施用化合物。优选的剂量为每天施用一次。在一些实施例中,一周至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21次施用化合物。在一些实施例中,一月至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21次施用化合物。在一些实施例中,每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21天施用一次化合物。在一些实施例中,每3天施用该化合物。在一些实施例中,每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15周施用一次化合物。在一些实施例中,每月施用该化合物。在一些实施例中,每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个月施用一次化合物。在一些实施例中,在至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69或70天的时间段内至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、

22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52或53周的时间段内至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52或53次施用化合物。在一些实施例中,在至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52或53个月的时间段内至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52或53次施用化合物。在一些实施例中,一周至少一次施用化合物,持续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69或70周的时间段。在一些实施例中,一周至少一次施用化合物,持续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69或70个月的时间段。在一些实施例中,一周至少两次施用化合物,持续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69或70周的时间段。在一些实施例中,一周至少两次施用化合物,持续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69或70个月的时间段。在一些实施例中,每两周至少一次施用化合物,持续至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69或70周的时间段。在一些实施例中,每两周至少一次施用化合物,持续至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69或70个月的时间段。在一些实施例中,每四周至少一次施用化合物,持续至少4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69或70周的时间段。在一些实施例中,每四周至少一次施用化合物,持续至少4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69或70个月的时间段。

[0208] 所述方法的受试者可以为哺乳动物,并且其包括人和非-人哺乳动物。在一些实施例中,受试者为人,诸如成年人。

[0209] 一些实施例包括用于在感染病毒的受试者中治疗HBV病毒的方法,该方法包括向

有此需要的受试者施用治疗有效量的本公开的一种或多种ASO或本公开的组合物,从而减少受试者内的病毒载量和/或减少受试者内的病毒抗原的水平。ASO可以与病毒中靶RNA的一部分互补或者杂交,例如HBV的第二X区和/或S区。

[0210] 在一些实施例中,本文所述的经修饰的寡核苷酸可以与一种或多种用于治疗 and/或抑制HBV和/或HDV复制的额外药剂组合地使用。当本文所述的化合物(例如,ASO)与额外药剂共同施用,有效量可以低于单独使用该化合物时的有效量。额外药剂包括但不限于干扰素、核苷/核苷酸类似物、衣壳组装调节剂(CAM)、siRNA、其他ASO、核酸聚合物或S-抗原转运抑制寡核苷酸聚合物(NAP或STOPS)、进入抑制剂和/或小分子免疫调节剂。额外药剂的实例包括ALG-010133、ALG-000184、重组干扰素 $\alpha$ 2b、IFN-a、PEG-IFN-a-2a、拉米夫定、替比夫定、阿德福韦酯、克拉夫定、恩替卡韦、替诺福韦艾拉酚胺、替诺福韦二吡呋酯、NVR3-778、BAY41-4109、JNJ-632、JNJ-3989(ARO-HBV)、RG6004、GSK3228836、REP-2139、REP-2165、AB-729、VIR-2218、DCR-HBVS、JNJ-6379、GLS4、ABI-H0731、JNJ-440、NZ-4、RG7907、EDP-514、AB-423、AB-506、ABI-H03733和ABI-H2158。在一些实施例中,本文所公开的ASO中的任一种与STOPS中的任一种共同施用。示例性STOPS描述于国际公开号W02020/097342和美国公开号2020/0147124中,这两篇均以引用方式整体并入本文。在一些实施例中,STOP为ALG-010133。在一些实施例中,本文所公开的ASO中的任一种与替诺福韦共同施用。在一些实施例中,本文所公开的ASO中的任一种与CAM共同施用。示例性CAM描述于Berke等人, *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, 61(8):e00560-17, Klumpp等人, *Gastroenterology*, 2018, 154(3):652-662.e8, 国际申请号PCT/US2020/017974、PCT/US2020/026116和PCT/US2020/028349以及美国申请号16/789,298、16/837,515和16/849,851,每一篇均以引用方式整体并入本文。在一些实施例中,CAM为ALG-000184、ALG-001075、ALG-001024、JNJ-632、BAY41-4109或NVR3-778。在一些实施例中,ASO和额外药剂同时施用。在一些实施例中,ASO和额外药剂顺序施用。在一些实施例中,在施用额外药剂之前施用ASO。在一些实施例中,在施用额外药剂之后施用ASO。

[0211] 定义

[0212] 如本文所用,术语“患者(patient)”和“受试者(subject)”是指待通过本公开的方法治疗的生物体。此类生物体优选地为哺乳动物(例如,海洋动物、猿类、马科动物、牛科动物、猪科动物、犬科动物、猫科动物等),并且更优选地为人。

[0213] 如本文所用,术语“有效量(effective amount)”是指足以实现有益或期望结果的化合物(例如,本公开的ASO)的量。有效量可以在一次或多次施用、应用或剂量中施用并且不旨在限于特定制剂或施途径。

[0214] 如本文所用,术语“治疗(treating)”包括导致病状、疾病、疾患等的改善或改善其症状的任何效果,例如减轻、降低、调节、改善或消除。

[0215] 如本文所用,术语“缓解(alleviate)”和“缓解(alleviating)”是指降低病状的严重性,诸如将严重性降低例如至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%。

[0216] 如本文所用,术语“药物组合物(pharmaceutical composition)”是指活性剂与惰性或活性载体的组合,使得该组合物特别适合体内或离体诊断或治疗用途。

[0217] 如本文所用,术语“药学上可接受的载体(pharmaceutically acceptable

carrie)”是指标准的药物载体中的任一种,诸如磷酸盐缓冲盐水溶液、水、乳液(例如,诸如油/水或水/油乳液)以及各种类型的润湿剂。该组合物还可以包含稳定剂和防腐剂。对于载体、稳定剂和佐剂的实例,参见,例如,Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences,第15版, Mack Publ. Co., Easton, PA[1975]。

[0218] 如本文所用,术语“约(about)”当指可测量值(例如重量、时间和剂量)时意在涵盖所引用的值和 $\pm 10\%$ 的范围。例如,“约10”应理解为“10”和“9至11”两者。

[0219] 如本文所用,术语“核碱基(nucleobase)”或“碱基(base)”是指形成核苷的含氮生物化合物。核碱基的实例包括但不限于胸腺嘧啶、尿嘧啶、腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤及它们的类似物或衍生物。

[0220] 在整个说明书中,在组合物被描述为具有、包括或包含特定的组分的情况下,或者在过程和方法被描述为具有、包括或包含特定的步骤的情况下,经考虑本另外公开的组合物也基本上由所述的组分组成,或者由所述的组分组成,并且根据本公开的过程和方法也基本上由所述的过程步骤组成,或者由所述的过程步骤组成。

[0221] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语具有与该发明所属领域中的普通技术人员通常所理解相同的含义。虽然类似或等效于本文所描述的那些方法和材料的任何方法和材料也可以用于本发明的实践或测试,但现在描述代表性的例示性方法和材料。

[0222] 在提供了值范围的情况下,应当理解的是,介于所述范围的上限与下限之间的每个中间值(到下限的单位的十分之一,除非另外明确说明)以及所述范围中的任何其他所陈述或中间值均涵盖于本发明内。这些较小范围的上限和下限可以独立地包括在更小的范围中,并且也涵盖在本发明内,这受制于所陈述的范围中的任何明确排除的限值。在所陈述范围包括限制中的一个或两个的情况下,排除那些被包括在内的限制中的任一个或两个的范围也包括在本发明中。

[0223] 本公开不限于所描述的特定实施例,因此可以变化。还应当理解,本文使用的术语仅用于描述特定实施例的目的,而不旨在是限制性的,因为本发明的范围将仅由所附权利要求限制。

[0224] 本领域技术人员在阅读本公开后将明白,本文描述和图示的每个单独实施例具有离散的组分和特征,该组分和特征可以容易地与其他几个实施例中的任何一个的特征分离或组合而不背离从本发明的范围或精神。任何记载的方法都可以按照记载的事件的顺序或逻辑上可能的任何其他顺序进行。

[0225] 本说明书中所引用的所有出版物和专利均以引用方式并入本文,如同各单独的出版物或专利被具体和单独地指出通过引用并入,并且以引用方式并入本文以公开和描述与所引用的出版物相关的方法和/或材料。对任何出版物的引用均由于其在申请日之前公开,不应解释为承认本发明因现有发明而无权先于此类出版物。进一步地,所提供的出版日期可以与实际出版日期不同,该实际出版日期可能需要独立确认。

[0226] 实例

[0227] 以下实施说明了本公开的某些实施例以帮助技术人员实践本公开。相应地,这些实例决不被认为限制本公开的范围。

[0228] 实例1:ASO合成

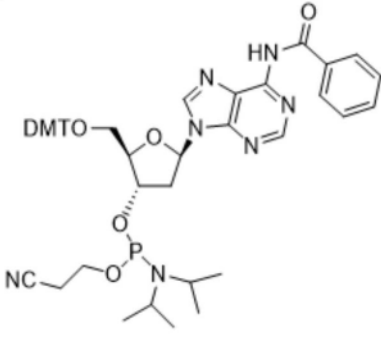
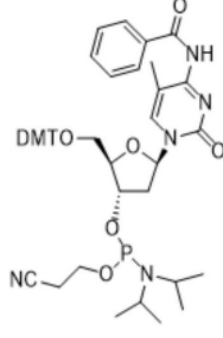
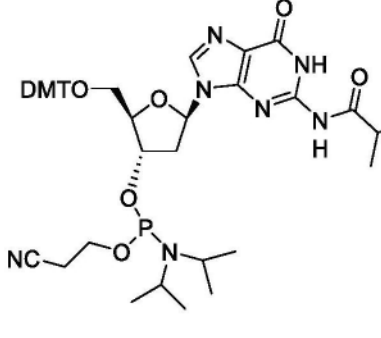
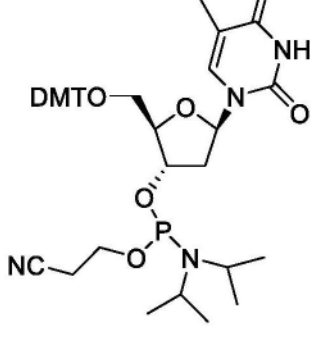
[0229] 间隔体ASO序列:DNA、2'-O-Me和LNA亚磷酰胺单体均购自商业可得来源(Hongene Biotech USA Inc.)。所有单体均在带有干燥剂的真空干燥器中干燥( $P_2O_5$ , 室温24h)。附接的通用固相支持体(CPG)获自ChemGenes公司。用于合成工作流程中的化学品和溶剂购自VWR/Sigma商业可得来源,并且无需任何纯化或处理即可使用。合成期间,将溶剂(乙腈)和溶液(酰胺(amidite)和活化剂)储存在分子筛上。

[0230] 对照和靶寡核苷酸序列是在Expedite 8909合成仪上使用制造商编写的标准循环合成的,并且修改了一些等待步骤和经修饰的偶联步骤。固相支持体为受控孔玻璃并且单体含有标准保护基团。每个嵌合寡核苷酸均使用商业可得5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-3'-O-(2-氰基乙基-N,N-二异丙基)DNA、2'-OMe和/或6-N-苯甲酰基腺苷( $A^{Bz}$ )、5甲基4-N-苯甲酰亚胺( $C^{Bz}$ )、2-N-异丁酰鸟苷( $G^{iBu}$ )和尿苷(U)或胸腺嘧啶核苷(T)的LNA亚磷酰胺单体,根据标准固相亚磷酰胺合成方案单独地合成。2'-O-Me-2,6-二氨基嘌呤亚磷酰胺购自Glen Research。将亚磷酰胺制备成0.1M的无水乙腈溶液。将5-乙基硫代四唑用作为活化剂,将二氯甲烷中的3%二氯乙酸脱三苯甲基化,THF中的乙酸酐和THF中的16%N-甲基咪唑用作为封端,DDTT((二甲基氨基亚甲基)氨基)-3H-1,2,4-二噻唑啉-3-硫酮用作为合成寡核糖核苷酸硫代磷酸酯的硫转移剂。在5-(乙硫基)-1H-四唑活化剂存在下,将0.1M亚磷酰胺的 $CH_3CN$ 溶液与固体结合的寡核苷酸进行延长偶联,然后进行延长加帽、氧化和脱保护,得到经修饰的寡核苷酸。所有经修饰的亚磷酰胺的逐步偶联效率均大于98.5%。

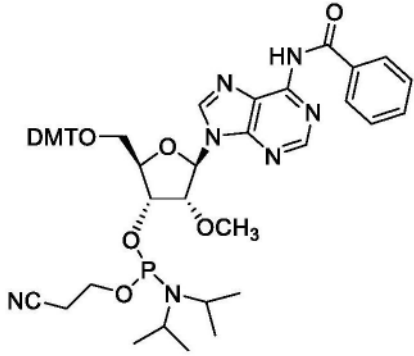
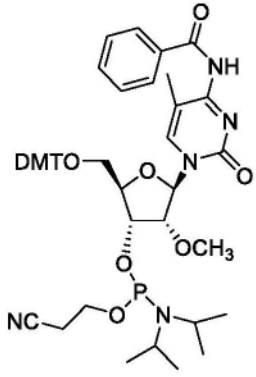
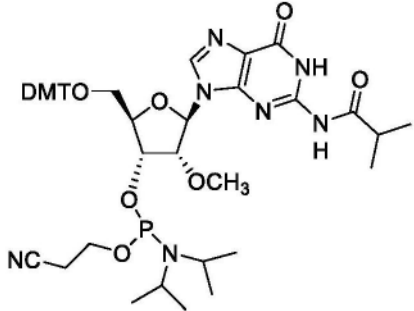
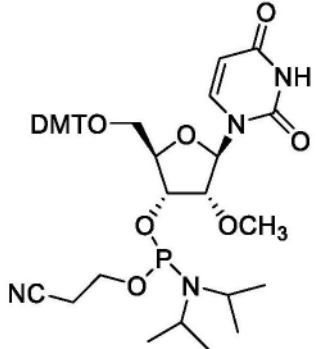
[0231] 在65°C使用氨甲胺的混合物(1:1,AMA)15min实现自固相支持体的脱保护和裂解。当使用通用接头时,脱保护在65°C进行90min,或者将固体支持物与氨水(28%)溶液在55°C加热8h以脱保护碱基不稳定的保护基。

[0232] 过滤去除固相支持体后,在GeneVac离心蒸发仪中真空去除脱保护溶液。

[0233]

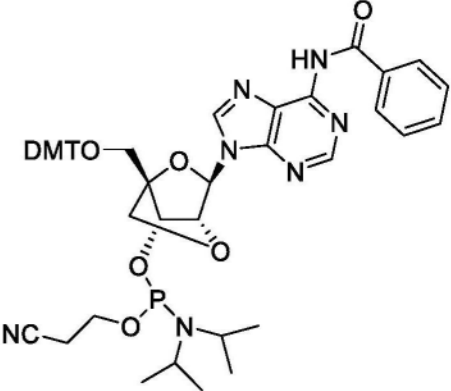
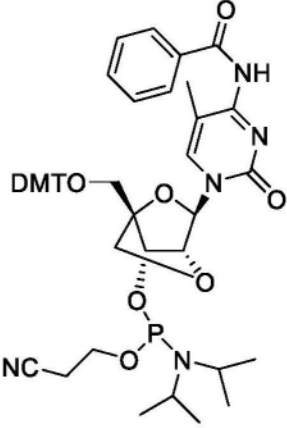
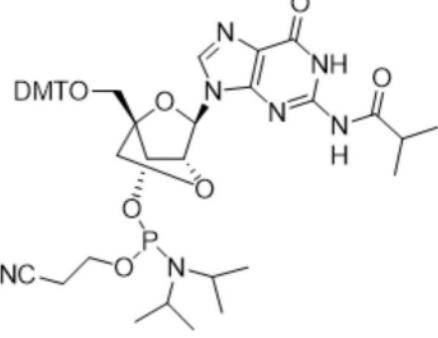
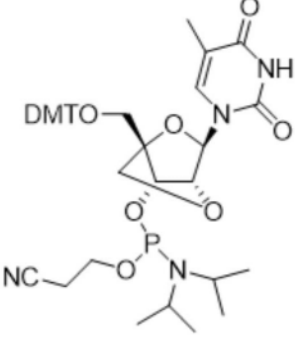
dA 亚磷酰胺	
(5-Me)-dC 亚磷酰胺	
dG 亚磷酰胺	
dT 亚磷酰胺	

[0234]

2'-OMe-A 亚磷酰胺	
2'-OMe-(5m)C 亚磷酰胺	
2'-OMe-G 亚磷酰胺	
2'-OMe-U 亚磷酰胺	

[0235] 锁核酸 (LNA) 亚磷酰胺

[0236]

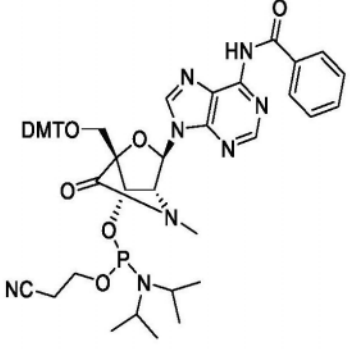
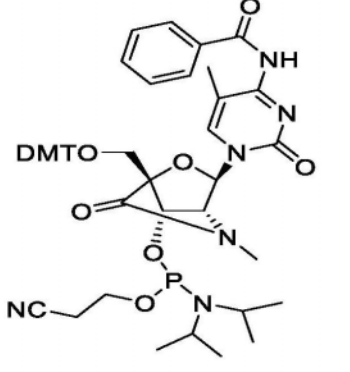
LNA-A 亚磷酰胺	
LNA(5m)C 亚磷酰胺	
LNA-G 亚磷酰胺	
LNA-T 亚磷酰胺	

[0237] 实例2:经修饰的间隔体序列

[0238] AmNA (N-Me) -T、AmNA (N-Me) -4-N-苯甲酰基 (5m) 胞苷 ((5m)C<sup>Bz</sup>)、AmNA (N-Me) -4-N-苯甲酰胞苷 (A<sup>Bz</sup>) 和AmNA (N-Me) -2-N-pac (G<sup>pac</sup>) 购自Luxna Biotech,而scp-BNA-T、scp-BNA-6-N-苯甲酰基腺苷 (A<sup>Bz</sup>)、scp-BNA-4-N-苯甲酰基-5甲基胞苷 ((5m)C<sup>Bz</sup>)、scp-BNA-2-N-异丁

酰鸟苷 ( $G^{iBu}$ ) 亚磷酰胺单体按照参考文献 (Takao Yamaguchi, Masahiko Horiba 和 Satoshi Obika; Chem. Commun., 2015, 51, 9737-9740; Masahiko Horiba, Takao Yamaguchi 和 Satoshi Obika; Journal of Organic Chemistry, 2016, 81, 11000-11008) 中描述的程序合成。所有单体均在带有干燥剂的真空干燥器中干燥 (KOH 和  $P_2O_5$ , 室温 24 小时)。在 AmNA (N-Me) -PS-DNA-PS 和 scp-BNA-PS-DNA-PS 的情况下, 使用亚磷酰胺单体在  $1\mu M$  上以 3' 至 5' 方向进行修饰合成, 在  $0.3M$  5-(苄硫基)-1H-四唑活化剂存在下, 在无水  $CH_3CN$  中稀释至  $0.12M$  浓度 (偶联时间 16min), 以形成固体结合的寡核苷酸, 然后进行修饰加帽、氧化和脱保护, 来得到经修饰的寡核苷酸。所有经修饰的亚磷酰胺的逐步偶联效率均大于 97%。DDTT (二甲氨基亚甲基) 氨基)-3H-1,2,4-二噻唑啉-3-硫酮用作寡核糖核苷酸硫代磷酸酯的合成的硫转移剂。用 20% DEA 乙腈溶液洗涤带有寡核苷酸的固相支持体 15min, 然后用 MeCN 彻底洗涤柱。将支持体与二异丙胺:水:甲醇 (1:1:2) 在加热块中于  $65^\circ C$  加热 8h, 以从载体上裂解并脱保护碱基不稳定的保护基团。

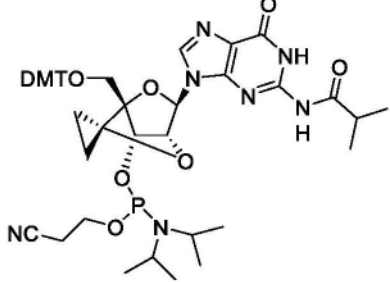
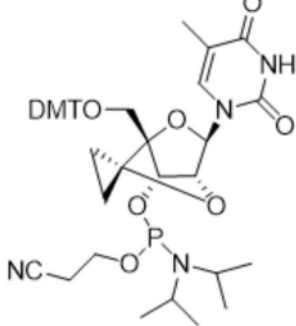
[0239] AmNA (N-Me) 单体

AmNA-NCH <sub>3</sub> -A 亚磷酰胺	
[0240] AmNA-NCH <sub>3</sub> -(5m)C 亚磷酰胺	

AmNA-NCH <sub>3</sub> -G 亚磷酰胺	
AmNA-NCH <sub>3</sub> -T 亚磷酰胺	

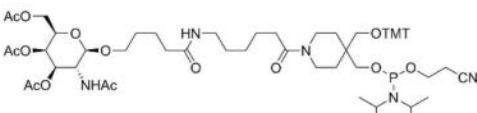
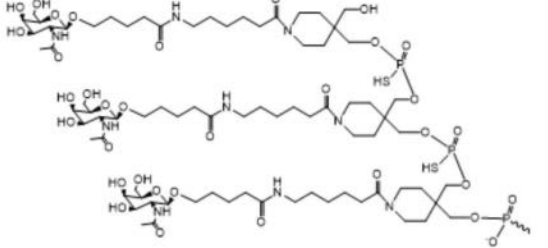
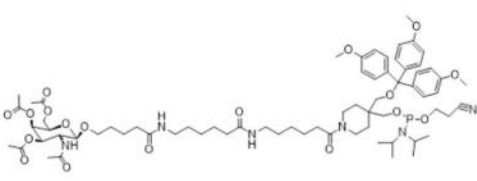
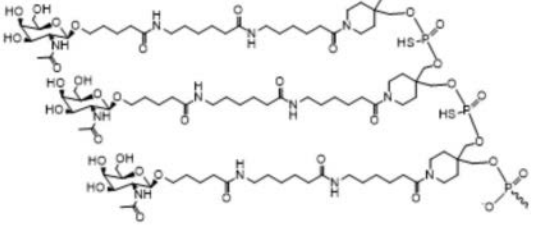
[0241] scp-BNA单体

scp-BNA-A 亚磷酰胺	
scp-BNA-(5m)C 亚磷酰胺	

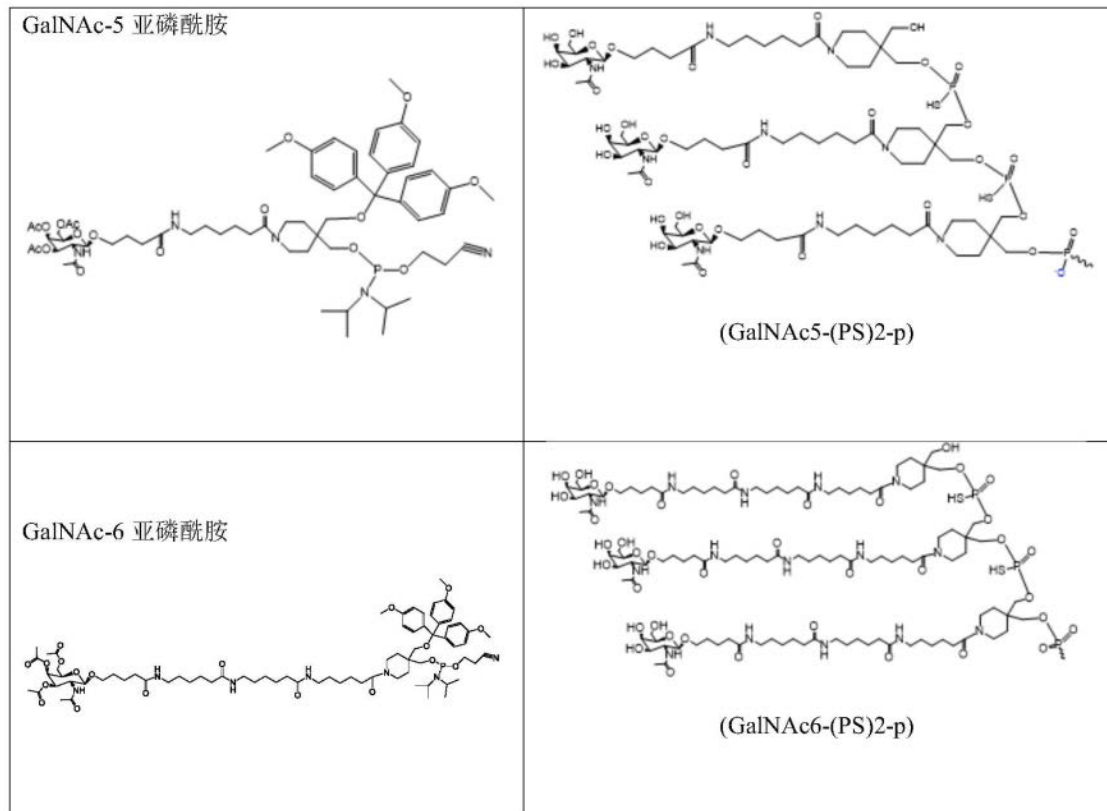
	<p>scp-BNA-G 亚磷酰胺</p>	
<p>[0242]</p>	<p>scp-BNA-T 亚磷酰胺</p>	

[0243] 5'和3'-GalNAc缀合的寡核苷酸被合成为具有不同长度的GalNAc部分,例如,如下所述。GalNAc3、GalNAc4、GalNAc5和GalNAc6在合成期间以与下述相同的方式用1、2或3个部分缀合到寡核苷酸。其他GalNAc部分,诸如本文先前描述的GalNAc-1和GalNAc-2,也可用于通过合成后缀合形成5'和3'-GalNAc。

[0244] GalNAc亚磷酰胺

	GalNAc 结构单元	附接到寡核苷酸后 (命名法)
<p>[0245]</p>	<p>GalNAc-3 亚磷酰胺</p> 	 <p>(GalNAc3-(PS)2-p)</p>
	<p>GalNAc-4 亚磷酰胺</p> 	 <p>(GalNAc4-(PS)2-p)</p>

[0246]



[0247] 粗寡聚物的定量或原始分析

[0248] 将样品溶解在去离子水 (1.0mL) 中并如下定量:首先在Nanodrop紫外分光光度计上仅用水进行空白。Nano Drop仪器可以通过使用多种路径长度来测量各种浓度范围的核酸。通过测量稀释的寡核苷酸在260nm处的吸光度,可以获得最准确的定量结果。粗材料储存于-20℃。

[0249] 粗HPLC/LC-MS分析

[0250] 粗样品的0.10D用于粗MS分析。确认粗LC-MS数据后,则进行纯化步骤。

[0251] HPLC纯化

[0252] 通过阴离子交换HPLC纯化磷酸二酯(PO)、硫代磷酸酯(PS)和嵌合的经修饰的寡核苷酸。缓冲剂为10% CH<sub>3</sub>CN中的20mM磷酸钠,pH 8.5(缓冲剂A)和10% CH<sub>3</sub>CN中的20mM磷酸钠,1.8M NaBr,pH 8.5(缓冲剂B)。将含有全长寡核苷酸的级分合并、脱盐并冻干。

[0253] 脂质缀合寡核苷酸通过内部包装的RPC-Source15反相柱纯化。缓冲剂为10% CH<sub>3</sub>CN(缓冲剂A)和CH<sub>3</sub>CN(缓冲剂B)中的20mM乙酸钠。将含有全长寡核苷酸的级分合并、脱盐并冻干。

[0254] 纯化寡聚物的脱盐

[0255] 然后使用Sephadex G-25M(Amersham Biosciences)将纯化的干燥寡聚物脱盐。用10mL去离子水调节筒三次。将彻底溶解在2.5mL去离子水中的纯化寡核苷酸以非常缓慢的逐滴地洗脱施加到筒上。用3.5ml去离子水将无盐寡聚物直接洗脱到螺帽小瓶中。

[0256] 最终HPLC和电喷雾LC/MS分析

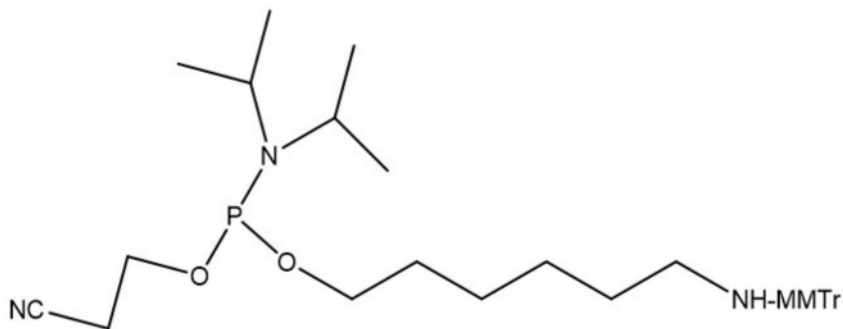
[0257] 将大约0.100D的寡聚物溶解在水中,并且然后移入特殊小瓶中进行IEX-HPLC和LC/MS分析。分析HPLC和ES LC-MS确定了嵌合寡核苷酸的完整性。

[0258] GalNAc酯与寡核苷酸的合成后缀合

[0259] 5'-C6-氨基前体合成

[0260] 使用通用支持体(加载 $65\mu\text{mol/g}$ )以 $10\mu\text{mol}$ 规模合成序列。在5'-末端引入C6-NH<sub>2</sub>接头,使用0.1M乙腈中的6-(4-单甲氧基三苯甲基氨基)己基-(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)-亚磷酰胺,偶联时间为10min。将带有寡核苷酸的固相支持体与氨水/甲胺(1:1)溶液在室温下在摇床上加热3h,以从支持体上裂解并使碱基不稳定的保护基脱保护。经过IEX纯化和脱盐后,C6-NH<sub>2</sub>经修饰的ASO用于进行合成后缀合。

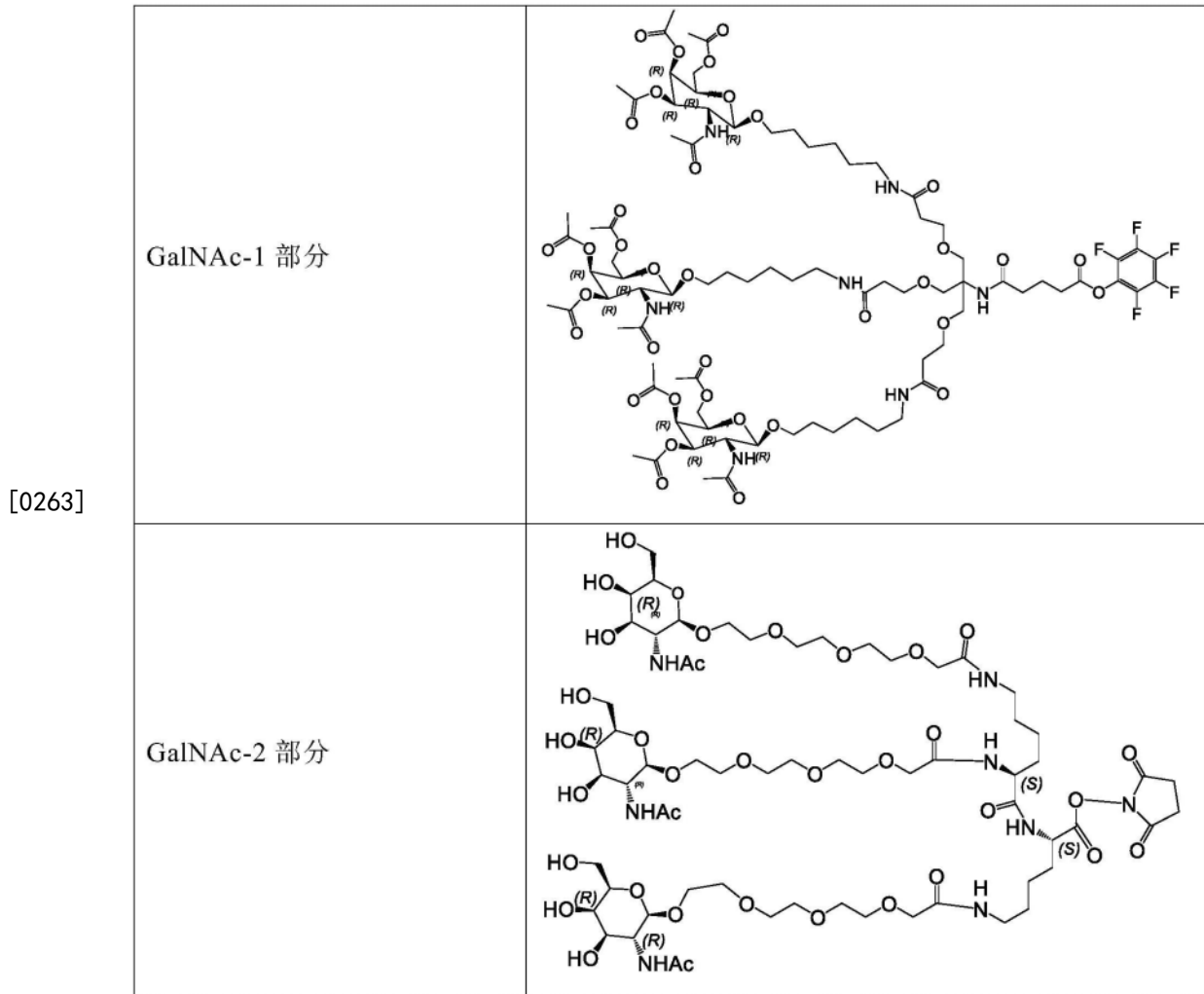
[0261]



5'-氨基修饰剂C6

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

[0262] 用于缀合的GalNAc酯



[0264] 5'-GalNAc合成的合成后綴合

[0265] 将5'-C6-NH<sub>2</sub>经修饰的序列溶解在0.2M碳酸氢钠缓冲剂中,pH 8.5(0.015mM),并且添加溶解在DMSO中的5-7mol当量的GalNAc酯。将反应混合物在室温下搅拌4h。对样品进行分析以确认是否存在任何未反应的氨基经修饰的ASO。向其中添加氨水(28重量%)(5×反应体积)并在室温下搅拌2-3h。将反应混合物在减压下浓缩,并将残余物溶解在水中,并在强阴离子交换柱上通过HPLC纯化。

[0266] 实例3:HBsAg释放测定体外分析

[0267] HepG2.2.15细胞(具有四个整合的HBV基因组的稳定细胞系)维持在含有10%胎牛血清(FBS)和1%青霉素/链霉素、1%谷氨酰胺、1%非必需氨基酸、1%丙酮酸钠和250μg/ml G418的DMEM培养基中。细胞维持在37℃、5% CO<sub>2</sub>气氛中。对于HBsAg释放测定,制备测定培养基:含有5% FBS、1%青霉素/链霉素、1%谷氨酰胺和1% DMSO的DMEM。测定前一天,用测定培养基将胰蛋白酶消化的HepG2.2.15细胞洗涤一次,以250g x 5min离心,用测定培养基重悬,并在涂有胶原蛋白的96孔板中以50,000个/孔的测定培养基中接种细胞。第二天,用Opti-MEM,9-pt,3倍稀释液稀释ASO,并根据制造商手册稀释Lipofectamine RNAiMAX(Invitrogen)。将ASO稀释液和RNAiMAX稀释液混合,在室温下放置5分钟,并向96孔板中的每个孔添加15μl。将板在37℃、5%CO<sub>2</sub>的孵育箱中放置5天。孵育后,收集上清液并用ELISA试剂盒(Diasino)测量HBsAg。使用CellTiter-Glo(Promega)测量细胞活力。使用Prism

Graphpad计算 $EC_{50}$ ,即相对于未处理的细胞对照将HBsAg分泌减少50%所需的药物的浓度。使用相同的软件计算 $CC_{50}$ ,即相对于未处理的细胞对照将细胞活力降低50%所需的药物的浓度。

[0268] 表1中化合物的所得 $EC_{50}$ 和 $CC_{50}$ 呈现在下表2中。 $EC_{50}$ 和 $CC_{50}$ 值如下:A:<1nM,B:1-10nM,C:10-100nM,D:>100nM。

ASO #	HepG2.2.15 HBsAg 释放测定 $EC_{50}$ (nM)	HepG2.2.15 细胞活力测定 $CC_{50}$ (nM)
1	B	D
2	C	D
3	B	D
4	C	D
5	B	D
6	B	D
7	B	D
8	B	D
9	B	D
10	B	D
11	D	D
12	D	D
13		
14		
15		
16		
17		
18		
19		
20		
21		
22		
23		
24		
25	B	C
26	A	C
27	A	D
28	B	C
29	A	C
30	A	C

[0269]

表 2.HBsAg 释放测定		
ASO #	HepG2.2.15 HBsAg 释放测定 EC <sub>50</sub> (nM)	HepG2.2.15 细胞活力测定 CC <sub>50</sub> (nM)
31	A	C
32	B	C
33	A	D
34	A	C
35	B	D
36	B	D
37	A	C
38	A	C
39	A	C
40	A	C
41	B	D
42	B	D
43	B	D
44	B	D
45	B	D
46	B	D
47	B	D
48	C	D
49	B	D
50	B	D
51	B	D
52	A	D
53	A	D
54	A	D
55		
56		
57		
58		
59		
60		
61		
62		
63		
64	B	D
65	B	D
66	B	D
67	B	D
68	B	D
69	A	D
70	B	D
71	B	D
72	B	D
73	B	D
74	C	D
75	A	D
76	A	D

[0270]

ASO #	HepG2.2.15 HBsAg 释放测定 EC <sub>50</sub> (nM)	HepG2.2.15 细胞活力测定 CC <sub>50</sub> (nM)
77	A	D
78	B	D
79	B	D
80	A	D
81	A	D
82	A	D
83	A	D
84		
85		
86		
87		

[0271]

[0272] 另外地,还评估了一些ASO在HBV感染的原代人肝细胞(PHH)中的体外效力。下面的表3提供了来自这些实验的示例性EC<sub>50</sub>和CC<sub>50</sub>数据。

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

[0273]

[0274] 实例4:熔融温度(T<sub>m</sub>)

[0275] 评估了本文所公开的几种示例性ASO的熔融温度,并且代表性结果提供在下表4中。

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

[0276]

[0277] 实例5:体内效力的改善

[0278] 使用标准亚磷酰胺化学在ABI 394和Expedite 8909合成器上合成具有所公开的化学的ASO。如上所述,使用HBsAg释放测定法在HepG2.2.15细胞中进行ASO的体外筛选。选择某些ASO进行N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)缀合,并在腺相关病毒(AAV)-HBV小鼠模型中以1x5mg/kg的单剂量进行测试。

[0279] 表5示出了与ASO 59相比,1x5mg/kg QW的示例性HBsAg最低点。在HBx区中的这些ASO中,针对包括HBx在内的所有HBV转录物,用nm1nA单一替换1nA可改善HBsAg的最低点。

ASO #	HBsAg 最低点 1x5mg/kg
-------	--------------------

[0280]

[0281]	84	-0.63 log <sub>10</sub> IU/ML
	85	-0.66 log <sub>10</sub> IU/ML
	86	-0.48 log <sub>10</sub> IU/ML
	87	-0.44 log <sub>10</sub> IU/ML

[0282] 该图示出了AS0 59和AS0 87的示例性并排比较,后者含有nm1nA,以及前者含有1nA。从图中可以看出,1nmnA的添加导致了效力的改善。

[0283] \*\*\*\*\*

[0284] 表6-靶基因序列

SEQ ID NO:	描述	序列
[0285] 89	乙型肝炎病毒 (Genbank 登录号 KC315400.1)	CTCCACCACTTTCACCAAACTCTTCAAGATCCCAGAGTCAGGG CCCTGTACTTTCCTGCTGGTGGCTCAAGTTCGGAACAGTAAAC CCTGCTCCGACTACTGCCTCTCCCATATCGTCAATCTTCTCGAG GACTGGGGACCCTGTACCGAATATGGAGAGCACCACATCAGGA TTCCTAGGACCCCTGCTCGTGTTACAGGCGGGGTTTTCTTGTTG ACAAGAATCCTCACAATACCACAGAGTCTAGACTCGTGGTGGGA CTTCTCTCAATTTCTAGGGGGAGCACCCACGTGTCCTGGCCAA AATTTGCAGTCCCAACCTCCAATCACTACCAACCTCTTGTC TCCAATTTGTCCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTTAT CATCTTCTCTTTCATCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGTTGGT TCTTCTGGACTACCAAGGTATGTTGCCGTTGTCCTCTACTCC AGGAACATCAACTACCAGCACCGGACCATGCAAAACCTGCACA ACTACTGCTCAAGGGACCTCTATGTTCCCTCATGTTGCTGTAC AAAACCTACGGACGGAAACTGCACCTGTATTCCATCCCATCAT CTTGGGCTTTCGAAAATACCTATGGGAGTGGGCTCAGTCCGT TTCTCTGGCTCAGTTACTAGTGCCATTTGTTCAAGTGGTTCGTA GGGCTTCCCCCACTGTCTGGCTTTCAGTTATATGGATGATGTG GTTTTGGGGGCCAAGTCTGTACAACATCTTGAGTCCCTTTATAC CGCTGTTACCAATTTTCTTTATCTTTGGGTATACATTTAAACCC TCACAAAAAAGATGGGGATATTCCTTAACTCATGGGA TATGTAATTGGGAGTTGGGGCACTTGCCTCAGGAACATATGT ACAAAAAATCAAGCAATGTTTTAGGAACTTCTGTAAACAGG CCTATTGATTGGAAAGTATGTCAACRAATTGTGGGTCTTTTGGG GTTTGCCGCCCTTTCACGCAATGTGGATATCCTGCTTAAATGC CTTTATATGCATGTATACAAGCTAAGCAGGCTTTTACTTTCTCG CCAACTTACAAGGCCTTCTGTGTAACAATATCTGAACCTTTA CCCCGTTGCTCGGCAACGGTCAGGTCCTTGCCAAGTGTGCTG ACGCAACCCCACTGGTTGGGGCTTGGCCATAGGCCATCAGCG CATGCGTGGAACCTTTGTGGCTCCTCTGCCGATCCATACTGCGG AACTCCTAGCAGCTTGTGTTGCTCGCAGCCGGTCTGGAGCAAAA CTTATCGGCACCGACAACCTCTGTTGCTCTCTCGGAAATACAC CTCCTTCCATGGCTGCTAGGATGTGCTGCCAAGTGGATCCTGC GCGGGACGTCCTTGTCTACGTCCCGTCGGCGCTGAATCCC GCGGACCCATCTCGGGCCGTTGGGACTCTACCGTCCCTTCT GCGTCTGCCGTTCCGCCGACACGGGGCGCACCTCTCTTTACG CGGTCTCCCCGCTGTGCCTTCTCATCTGCCGACCGTGTGCAC TTCGTTACCTCTGCACGTCGCATGGAGACCAGTGAACGCC CACGGGAACCTGCCCAAGGTCTTGATAAGAGGACTCTTGGAC TTTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGAC TGTGTGTTTACTGAGTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGTTAGGT TAAAGGTCTTTGTAAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTGTGT TCACCAGCACCATGCAACTTTTTCACCTCTGCCTAATCATCTCAT

[0286]

SEQ ID NO:	描述	序列
		GTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG CTTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAGCTTC TGTGGAGTTACTCTCTTTTTTGCCTTCTGACTTCTTTCCTTCTATT CGAGATCTCCTCGACACCGCCTCTGCTCTGTATCGGGAGGCCTT AGAGTCTCCGGAACATTGTTACCTCACCATACGGCACTCAGGC AAGCAATTCGTGTTGGGGTGAGTTAATGAATCTAGCCACCTGG GTGGGAAGTAATTTGGAAGATCCAGCATCCAGGGAATTAGTAG TCAGCTATGTCAACGTTAATATGGGCCTAAAAATCAGACAAC ATTGTGGTTTACATTTCCCTGTCTTACTTTTGGGAGAGAAAAC TCTTGAATATTTGGTGTCTTTTGGAGTGTGGATTTCGCACCTCC TGCATATAGACCACAAAATGCCCTATCTTATCAACACTTCCGG AAATACTGTTGTTAGACGAAGAGGCAGGTCCCCTAGAAGAAG AACTCCCTCGCTCGCAGACGAAGGTCTCAATCGCCGCGTCGCA GAAGATCTCAATCTCGGGAATCTCAATGTTAGTATTCTTGGAC ACATAAGGTGGGAACTTACGGGGCTTATTCTTCTACGGTAC CTTGCTTTAATCTAAATGGCAAACCTCTTCTTTTCTGACATTC ATTTGCAGGAGGACATTGTTGATAGATGTAAGCAATTTGTGGG GCCCTTACAGTAAATGAAAACAGGAGACTTAAATTAATTATG CCTGCTAGGTTTTATCCCAATGTTACTAAATATTTGCCCTTAGAT AAAGGGATCAAACCCTATTATCCAGAGTATGTAGTTAATCATT CTTCCAGACGCGACATTATTTACACACTCTTTGGAAGGCGGGGA TCTTATATAAAAGAGAGTCCACACGTAGCGCCTCATTTTGC TCACCATATCTTGGGAACAAGATCTACAGCATGGGAGGTTGGT CTTCCAAACCTCGAAAAGGCATGGGGACAAATCTTCTGTCCCC AATCCCTGGGATTCTTCCCCGATCATCAGTTGGACCCTGCATT CAAAGCCAACCTCAGAAAATCCAGATTGGGACCTCAACCCACAC AAGGACAACCTGGCCGACGCCAACAAGGTGGGAGTGGGAGCA TTCGGCCAGGGTTCACCCCTCCTCATGGGGACTGTTGGGGTG GAGCCCTCAGGCTCAGGGCATATTCACAACAGTGCCAGCAGCT CCTCTCTGCTCCACCAATCGGCAGTCAGGAAGGCAGCCTAC TCCCTTCTCTCCACCTCTAAGAGACACTCATCTCAGGCCATGC AGTGGAA
90	乙型肝炎病毒 (Genbank 登录号 U95551.1)	AATTCACAACCTTTCACCAAACCTCTGCAAGATCCCAGAGTGAG AGGCCTGTATTTCCCTGCTGGTGGCTCCAGTTCAGGAGCAGTAA ACCCTGTTCCGACTACTGCCTCTCCCTTATCGTCAATCTTCTCGA GGATTGGGGACCCTGCGCTGAACATGGAGAACATCACATCAGG ATTCTAGGACCCCTTCTCGTGTTACAGGCGGGTTTTTCTTGTT GACAAGAATCCTCACAATACCGCAGAGTCTAGACTCGTGGTGG ACTTCTCTCAATTTTCTAGGGGGAACTACCGTGTGTCTTGGCCA AAATTCGCAGTCCCCAACCTCCAATCACTACCAACCTCCTGTC CTCCAACCTGTCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTTA TCATCTTCTCTTCATCCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGTTGG TTCTTCTGGACTATCAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCTCTAATTC CAGGATCCTCAACCACCAGCACGGGACCATCCCGAACCTGCAT GACTACTGCTCAAGGAACCTCTATGTATCCCTGCTTGTGCTGTA CCAAACCTTCGGACGGAAAATTGCACCTGTATTCCCATCCCATCA TCCTGGGCTTTCGGAAAATTCCTATGGGAGTGGGCCTCAGCCCC TTTCTCCTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTTCAAGTGGTTCGT AGGGCTTCCCCCACTGTTTGGCTTTCAGTTATATGGATGATGT GGTATTGGGGGCAAGTCTGTACAGCATCTTGAGTCCCTTTTFA CCGCTGTTACCAATTTCTTTTGTCTTTGGGTATACATTTAAACC CTAACAAAACAAGAGATGGGGTACTCTCTGAATTTTATGGGT TATGTCATTGGAAGTTATGGGTCTTGGCCACAAGAACACATCAT ACAAAAATCAAAGAATGTTTTAGAAAACCTTCTATTAACAGG CCTATTGATTGGAAAGTATGTCAACGAATTGTGGGTCTTTGGG TTTTGTGCCCCATTTACACAATGTGGTTATCCTGCGTTAATGCC CTTGTATGCATGTATTCAATCTAAGCAGGCTTTCACCTTCTCGCC

[0287]

SEQ ID NO:	描述	序列
		AACTTACAAGGCCTTTCTGTGTAACAATACCTGAACCTTTACC CCGTTGCCCGGCAACGGCCAGGTCGTGCCAAGTGTGCTGAC GCAACCCCCACTGGCTGGGGCTTGGTCATGGGCCATCAGCGCG TGCGTGGAACCTTTTCGGCTCCTCTGCCGATCCATACTGCGGAA CTCCTAGCCGCTTGTGTTGCTCGCAGCAGGTCGGAGCAAACAT TATCGGGACTGATAACTCTGTTGTCTCTCCCGCAAATATACAT CGTATCCATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGC GGGACGTCCTTTGTTTACGTCCCGTCGGCGCTGAATCCTGCGGA CGACCTTCTCGGGGTCGCTTGGGACTCTCTCGTCCCCTTCTCCG TCTGCCGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTACGCGG ACTCCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTC GCTTACCTCTGCACGTCGCATGGAGACCACCGTGAACGCCAC CGAATGTTGCCAAAGGTCTTACATAAGAGGACTCTTGGACTCTC TGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGTT TGTTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGATTA GGTCTTTGTAAGACTGGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGCGCAC CAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTTC ATGTCCTACTGTTCAAGCCTCAAGCTGTGCCTTGGGTGGCTTT GGGGCATGGACATCGACCCTTATAAAGAATTTGGAGCTACTGT GGAGTACTCTCGTTTTTGCCTTCTGACTTCTTTCCTCAGTACG AGATCTTCTAGATAACCGCCTCAGCTCTGTATCGGGAAGCCTTAG AGTCTCTGAGCATTGTTACCTCACCATACTGCACTCAGGCAA GCAATCTTTGCTGGGGGAACTAATGACTCTAGCTACCTGGGT GGGTGTAATTTGGAAGATCCAGCATCTAGAGACCTAGTAGTC AGTTATGTCAACACTAATATGGGCCTAAAGTTCAAGCAACTCTT GTGGTTTACATTTCTTGTCTCACTTTTGGGAAGAGAAACCGTTA TAGAGATTTGGTGTCTTTCGGAGTGTGGATTCGCACCTCCA GCTTATAGACCACCAAATGCCCTATCCTATCAACACTTCCGGA AACTACTGTTGTTAGACGACGAGGCAGGTCCCCTAGAAGAAGA ACTCCCTCGCTCGCAGACGAAGGTCTCAATCGCCGCGTCGCAG AAGATCTCAATCTCGGGAACCTCAATGTTAGTATTCCTTGGACT CATAAGGTGGGGAACCTTACTGGTCTTATTCTTCTACTGTACCT GTCTTTAATCCTCATTGGAAAACACCATCTTTTCTAATATACAT TTACACCAAGACATTATCAAAAAATGTGAACAGTTTGTAGGCC CACTTACAGTTAATGAGAAAAGAAGATTGCAATTGATTATGCCT GCTAGGTTTTATCCAAAGTTACCAAATATTACCATTGGATAA GGGTATTAACCTTATTATCCAGAACATCTAGTTAATCATTACT TCCAAACTAGACACTATTTACACACTCTATGGAAGGCGGGTATA TTATATAAGAGAGAAAACAACACATAGCGCCTCATTGTTGGGTC ACCATATTCTTGGGAACAAGATCTACAGCATGGGGCAGAATCT TTCCACCAGCAATCCTCTGGGATTCTTCCCGACCACCAGTTGG ATCCAGCCTTCAGAGCAAACACAGCAAATCCAGATTGGGACTT CAATCCCAACAAGGACACCTGGCCAGACGCCAACAAGGTAGGA GCTGGAGCATTTCGGGCTGGGTTTACCCACCGCACGGAGGCC TTTTGGGGTGGAGCCCTCAGGCTCAGGGCATACTACAAACTTTG CCAGCAAATCCGCTCCTGCCTCCACCAATCGCCAGACAGGAA GGCAGCCTACCCGCTGTCTCCACCTTTGAGAAACTCATCTCT CAGGCCATGCAGTGG
91	17β-HSD 13 型 编码序列 (Genbank 登录 号 NM 178135.5) (核 苷酸 42 至 944)	ATGAACATCATCCTAGAAATCCTTCTGCTTCTGATCACCATCAT CTA CTCTACTTGGAGTCGTTGGTGAAGTTTTTCATTCTCAGA GGAGAAAATCTGTGGCTGGGGAGATTGTTCTCATTACTGGAGCT GGGCATGGAATAGGCAGGCAGACTACTTATGAATTTGCAAAAC GACAGAGCATATTGGTTCTGTGGGATATTAATAAGCGCGGTGT GGAGGAAACTGCAGTGTGAGTCCGAAAACACTAGGCGTCACTGCG CATGCGTATGTGGTAGACTGCAGCAACAGAGAAGAGATCTATC GCTCTCTAAATCAGGTGAAGAAAGAAGTGGGTGATGTAACAAT CGTGGTGAATAATGCTGGGACAGTATATCCAGCCGATCTTCTCA

SEQ ID NO:	描述	序列
		GCACCAAGGATGAAGAGATTACCAAGACATTTGAGGTCAACAT CCTAGGACATTTTGGATCACAAAAGCACTTCTTCCATCGATGA TGGAGAGAAATCATGGCCACATCGTCACAGTGGCTCAGTGTG CGGCCACGAAGGGATTCTTACCTCATCCCATATTGTTCCAGCA AATTTGCCGCTGTTGGCTTTCACAGAGGTCTGACATCAGAACTT CAGGCCTGGGAAAAACTGGTATCAAAACCTCATGTCCTGCCC AGTTTTTGTGAATACTGGGTTACCAAAAAATCCAAGCACAAAGT TATGGCCTGTATTGGAGACAGATGAAGTCGTAAGAAGTCTGAT AGATGGAATACTTACCAATAAGAAAATGATTTTTGTCCATCGT ATATCAATATCTTCTGAGACTACAGAAGTTTCTTCCCTGAACGC GCCTCAGCGATTTTAAATCGTATGCAGAATATTCAATTTGAAGC AGTGGTTGGCCACAAAATCAAAATGAAATGA
92	MCJ mRNA (GenBank 登录号 NM_013238.3)	AGTCACTGCCGCGCGCCTTGAGTCTCCGGGCGCCTTGCCATG GCTGCCCCTGGTGTCTATCGCTCCAGTTGGCGAGAGTTTGCGCTA CGCTGAGTACTTGCAGCCCTCGGCCAAACGGCCAGACGCCGAC GTCGACCAGCAGAGACTGGTAAGAAGTTTGATAGCTGTAGGAC TGGGTGTTGCAGCTCTTGCATTTGCAGGTCGCTACGCATTTCCGG ATCTGGAAACCTCTAGAACAAGTTATCACAGAAACTGCAAAGA AGATTTCAACTCCTAGCTTTTCATCCTACTATAAAGGAGGATTT GAACAGAAAATGAGTAGGCGAGAAGCTGGTCTTATTTTAGGTG TAAGCCCATCTGCTGGCAAGGCTAAGATTAGAACAGCTCATAG GAGAGTCATGATTTTGAATCACCCAGATAAAGGTGGATCTCCTT ACGTAGCAGCCAAAATAAATGAAGCAAAGACTTGCTAGAAAAC AACCACCAAACATTGATGCTTAAGGACCACACTGAAGGAAAAA AAAAGAGGGGACTTCGAAAAAAAAAAAAAGCCCTGCAAAATAT TCTAAAACATGGTCTTCTTAATTTTCTATATGGATTGACCACAG TCTTATCTTCCACCATTAAGCTGTATAACAATAAAATGTTAATA GTCTTGCTTTTTATTATCTTTTAAAGATCTCCTTAAATTCTATAA CTGATCTTTTTTCTTATTTTGTGTTGTGACATTCATACATTTTAAAG ATTTTTGTTATGTTCTGAATTCCTCCCTACACACACACACACAC ACACACACACACACACGTCAAAAAATATGATCAAGAATGCAA TTGGGATTTGTGAGCAATGAGTAGACCTCTTATTGTTTATATTT GTACCCTCATGTCAATTTTTTTTTAGGGAAATTTGGGACTCTGCC TATATAAGGTGTTTTAAATGTCTTGAGAACAAGCACTGGCTGAT ACCTCTTGAGATATGATCTGAAATGTAATGGAATTTATTAAT GGTGTTTAGTAAAGTAGGGGTTAAGGACTTGTTAAAGAACCCC ACTATCTCTGAGACCCTATAGCCAAAGCATGAGGACTTGGAGA GCTACTAAAATGATTCAGGTTTACAAAATGAGCCCTGTGAGGA AAGGTTGAGAGAAGTCTGAGGAGTTTGTATTTAATTATAGTCTT CCAGTACTGTATATTCATTACTACTCATTCTACAAATATTTATT GACCCCTTTGATGTGCAAGGCACTATCGTGCCTCCCTGAGAG TTGCAAGTATGAAGCAGTCATGGATCATGAACCAAAGGAACTT ATATGTAGAGGAAGGATAAATCACAAATAGTGAATACTGTTAG ATACAGATGATATATTTTAAAAGTTCAAAGGAAGAAAAGAATG TGTTAAACACTGCATGAGAGGAGGAATAAGTGGCATAGAGCTA GGCTTTAGAAAAGAAAAATATTCCGATACCATATGATTGGTGA GGTAAGTGTTATCTGAGATGAGAATTAGCAGAAAATAGATATA TCAATCGGAGTGATTAGAGTGCAGGGTTTCTGGAAAGCAAGGT TTGGACAGAGTGGTCATCAAAGGCCAGCCCTGTGACTTACACT GCATTAAATTAATTTCTTAGAACATAGTCCCTGATCATTATCAC TTTACTATTCCAAAGGTGAGAGAACAGATTCAGATAGAGTGCC AGCATTGTTCCAGTATTCCTTTACAAATCTTGGGTTTATTCCA GGTAACCTGAACACTACTGCATTTCTATCTTAAATACTTTTTTA GATATCTAGATGCATCTTTCAACTTCTAACATCTGTAGTTTAG GAGTCTCAACCTTGGCATTATTGACATGTTAGGCCAAATAAAT TTTTTGTGGGAGGTCTCTGTGCGTTTTAGATGATTAGCAATA ATCCCTGACCTGTTATCTACTAAAGACTAGTCGTTTCTCATCAG

[0288]

[0289]

SEQ ID NO:	描述	序列
		TTGTGACAACAAAAATGGTTCCAGATATTGCCAAATGCCCTTA GAGGACAGTAATCGCCCCAGTTGAGAACCATTTCAGTAAAAC TTTAATTACTATTTTTTCTTTTGGTTTATAAAAAAATGATCCTGA ATTA AATTGATGGAACCTTGAAGTCGATAAAAATATATTTCTTGC TTTAAAGTCCCACATACGTGTCCTACTAATTTTCTCATGCTTAGT GTTTTCACTTTTCTCCTGTTATCCTTGTACCTAAGAATGCCATCC CAATCCCCAGATGTCCACCTGCCCAAAGTCTAGGCATAGCTGA AGGCCAAGCTAAAATGTATCCCTCTTTTCTGGTACATGCAGCA AAAGTAATATGAATTATCAGCTTTCTGAGAGCAGGCATTGTATC TGTCTTGTGGTGTACATTGGCACCCAATAAATATTTGTTGA GTGAATGAATAAATTCCCATAGCACTTTATTCTTCACATGGTAC ATA ACTATAGGGGCTATAGCTTGGTACCTTGTGAAGCAACTCTT GGTGTAACATACCTTATTTCTCATACTAAAATGCAAGAACCCTT AGAGCAAGGATCTTGCCATTCATCTTGTAACTCTTACTCTG GAGCACTTGCATTTAGCAGGCATCATAAAGTTTTACGTACCAAG AAAATGTTGCTGTTTTCTGAATACTATGCATCAAAAAATGTTAC CACTAATTTTTAAAGCTCTGCTAAGGAATATTGGGGCACCTCA GATGCACCTTTAATTGATGTCATATTTTCTAATCCATACTTTA TTCATGAGAATTTGAGTCACCCAGCATTAGCTTGGAAATTTCT TATTTCCATTTGCTTTGCAGGTGCCTTGGAGTCAGATCTGGTTT TGAATACTATCTCCTGTTATGTGATCTTGGGCAGTTACTTAATT TTCTAGTCAATAACCCGTATCTATAAAAATAGAGAAAATAATCCT ACACACCGGGGCTGTTGTGGGGCGGGGAGAGGGGGGAGGGA TCGCATTGGAGATATACTAATGTAAATGACAAGTTAATTGGTG CAGCACACCAACATGGCTCATGTCTACATATGTAACAAAACCTGC ACGTTGTGCACATGTGCCCTAGA ACTTAAAGTATAATAAAAAAG AAATTTTAAAAAATCCTGTCAAATAAGGTTATAGTAGAGAATA AGGATGTGTAAAGCATTTAGTCACGTAAATGCTTAAAAAATG TAATTTTTACTTCTTTCACTGCCTCATTTAATTAGTTTTATCTTA ATAATACCTTGGATTCAGGGTAAAGTTTCAGTTATGTCCAGTA ATCATTATTTTACCCTCGAATCTGCAATTTGGATAGAACATGG TGGGGACAGCTCGTCTCTATTCTTGCAGCATTAAACAGGCTGGA GGCACCCTTCTCTGGCCAGCAAGTTGGGCCTGGTTGTTGGCTG AGAGCCTCAGTTCCTTTCTGCACAGGTTCTCTTTACATAGGCTT CTCAACAGGGCTACTAGAGCATCGTCACCATAGCAGCTGTCTTA TAACAGAGAGTGGTTCGGTCTGAGAGACAAAAAATGGAAGTGC CAAATGTTCTGGGTCTGGA AACTGTCAGGGCATCACTTGTGCC ATATTCAGTTGGCCTAAGAATTACAGAGCCTGCCTCGATTCAA GGGAGAGGATAGAGAGGACTGAAGGAATCAGTGCTCATCTTTA ATATGCAGCAGGACAGGTTTGGGATTTTTTTTCCCCCTTGAGTC TGTGAAGGCATTACTTAAGAACAAAGTCAGGCATGTATAATTG AACTACAGTTACTTGAAATATAAGCCCAGAAAAGTTTCAGATAA TAAATACA ACTATTTTTCTGCTGTTACCCTTGTACCTAAAGATG CCATCCTAATCCCCAGATCTCCACA ACTATACCTACATAGTAGA AGGTTAAAATGTATCCCTCTTTTCTGGTGCATCCAGCAAAAAGT AATATCATGAATTATGAGCTCTCTGAGAGCAAGGATCATATCA GTCTTGTATTATTGTTGCAGTGAACAAGTACAGTTGCAGATATTC AGGAGTAATTATCTAAATGGCAGTAGGCTTATAAACTGAATTT TCACCAGCCACACCCTCCCCCAACTCCTTATCTGTAAAAAGCT TATTTGAGTGGTTACCTGTCTTCAGTAAAGATTGCGCTTGCATA TTTGCTGTCA TTGCATATTCTGCTTAATTAAGCTCTGTTGATATT GCAGTTTCTGTGCATACTTACATCTTAGATGCAATCTGAGGGCC TAGGAAGGCCTTTTAAAAAATAAAACAATTCCGATTGCAGAGAA AGTGTAAGTCAAGGACAGTTAATTCAAGGGGAACATAGAAAGC TATTTAGATTTTAGTTGATGGTGCCAGTCTTCAGCGTAAAGTCA AAAGTGGAGGGAAAGTTTAGTAAGGAAAAAATGTTGGGCTTGG ATACATTGTTTAGTCTTCAAAGCACTTTACTTTTTATGAAATATA

[0290]

SEQ ID NO:	描述	序列
		TTTTAGACATTCAGCAAATATTGAATACTTACTATATCAGGCAG TAAAGATATAAAATTCATTCTTAAAAATGTGCAACATGTTCAAAC GAAAAAATACATTCTTAAACAGGAAACTTTTTCTTCATACTT TTTAATTAACAAGACATATAAGAGTTGCATTAATGGGCGTGCTT ATGATTGATCACCCAGCAGCATCATTAGAAATAATATATTTTAT TCATGTGCAGAAATCTTTTGTTGTCTGGGGAACCTTGAACAC AGAAAAGAGCTTTTATTGATAAGGTAATTGAACACACTTGACA ATTAGCTTAATATGGTTTAAATACCATTTGTGGGAGAAGATGAAT CAGCCAGGCTCTTTACGTCAAGAATATGAAGTTTCTCTTGAGTC AACCAACTTAAGATGAGCTACGGAGACTGCAGTGAAAAGTTAA ATATCCAAGTACACCAGCCAATTCACACAGTGGAAACCATGCT GTCCTCGGGCACCCTGCACCTCGCCCAACAGTCATCAACTAGAT GGAGGCTCCTGGCTGCAAGGAGGATTTGATGGGAATGAGTAAA TGTGTCAGCATAGTCCGTCCTTCTAATGGAAAAGCAACCCAAA GAGCAAATCCTATTAATGGCTGGATCAGTATCATCTACTTGTCA AAAACATTCATGAATTATGAGTCAAAAATTTATTTATGGTGGC ATTACACACATTAAGAGATGAGGACTTCTGTTAGCATAATTTAT TAGCTGAAAAGTTGAGAAGGTTCTCTGGACTCATTTTTATAGG TGGAACCTAAGTGATCTGGATAATTGCCACCAGCAAAAATTGCT GGGCATGGTGGACAAAAGAAAATGTTCTTCTAATGATTTTTTAT GAGCTGAGTAGCTATTGTTCCAGCTGAGTGCTCTTTTCTCTTT TTATTGTTGCTGAGCAAAAGAATTTATAAAAAGCTCTTTCTTTT GTATTA AAAACCCTGCTCAATTGAAATGCAAGTTCATTAAGTAA TCTTCATTTCTTCTCCTGCCATAATAACCCTTTCCCTCTCTGTT GATTCAACAGTATCTAGCAGCACTGCTCCAAATTTAAGTCTGA ACAGACTATATTACATAGATGTAGAGAAATACTCAATCTTCAGC ATTAAGAGGGAGCTTAATTTACACACGGGTGGAATATGATCACT CAGGCTAGATGTTGGCCATAAATTCAAATTAGTATCTCAACTT AGCAGGGGGGATCAACAGTGGCAAACTTCAATTATGACAGGAT AAAAATCACATAGAGATATTGGTTCAATATGGACATCTAAACT ATAATGCTAAAAGCCAATAATTAGAATAAGTTCATTTAAGAA AAGCATTAAATAATATTAGCTAACGTTTAGTACCTGTGCCAAACA TTCTACCTATGTTACCTTGATTTTCATAGCCAGCCTAAGAGGTA CTATTATGTATCCCCATTTACAGGTTAAGAAACAGGCTCAGAG GAGTTTAGGATCTTTTCCAAGATTACATAGCCAGTAAGTGGTGG CACTAGGAACCAAAATTCAGACTCTGAATCGCATGCTGTTTATAT TATATTGCACTCATTTCTAAATATGTGGGAATCAGAATGAAGGG GCTTGTATGACTTTTGGCTCATTTTTTTGATGCATGTGACCTGGGA TTATAAATGTGAAATTAGGTTTACGAAAGGATCCAGTGTCAATTG TGCATCATGGGCAAGGAGTACCTAATCTCTTTAATTCTTCCCTG GAAGCTTACGATGTCCATCCAAGTGCACATAGCAAAAAGTCTGT TGTA AAGTTTAGCAGAGTGACTTTCTTTGACTCAGAGTGATGAC GGAGGAAGCTTTGATAAGATTTTATCTGAAATGTTTATGGACAA GAGCTTTCAAGGAGAACATCCAGAGCAAGGTTCTGAAGACAGC TCATGAAGGTGAAGCAGCAGACCTGGCACAAGAAATGAAGAG AGAGCTCAGTGTATTAAGATGAAAACAAGAAAACCGAATATA TTGAAAGGAGCAGAGAGGCAATGAAAACAAGACA ACTGAAAT GAGGTA ACTTGCAGCAATTGAAAGGGAATTCAGTACTTTTATA GAATCTTAAAAATGTTTCTGCTGTTATTTTCAATTTTGAAC AGGGTATTTGTCCATGCCATACTTTTTTGGCAAAATCCAAAAT TGTGTATAGTTCTATAGTTGTCTGGTGGAGTCAATGGAAC TTTA GTTACCAGTCTAAGAATGTGTCTTTGAGATTGTCCAGTTAATTC TCTATTTCCAGTAGCTGTAATAAATGGTGAAAAGGTTTCTGACT CCTGGAGAAAAGTTTCTAACTCCTTATGACTAATATTCATAACAG ACTTGTGAGTTCCTTGAACATGGATACACCTATATGCAAGAGTG TATTCCAAAAGCTAACTCAGTGATCTTTCCATTTATCTATTTCTGG ATTAGTGGTGCCTTTGCTCTTCTCTGTA AATGTGAATAGTTA

SEQ ID NO:	描述	序列
		AGAGTTGACTGCAGAAGTGTTACACTTTGGCTTCCATGCCTCT GGAATGTTTGTGCTTTGGTGGTGAGATGTGAGACTATATTTGTA TAGTCTGCATCTCTCAGGCTGCCCCAGAATGTTGTACAGTGCAG TGCTGAAGAAAGCAGCAGGTACACACAGAAATGCAGCCTTTCC TGGTTAACCTGCTTGGATCTGAGTTACACTTTGTTTCCCTGACTT CTTGGGACTTAGGTAATCAGTTTGCTTCTACTCTATCTCATTTT GTACTCGCTTACATACTACATTCTTGTGTTGGGCTTTCGTTTCTTC TTGTAAGCAGAGATTTTTTAAAAATCCAATATGTGAAAAATACGGA TGCCTACAATTAATAATAATAAAATGCTGTTGTGTTTGTGTTTGC TTTTAAATGTAAAGGATAAACAATAAGATAGTTTTATCTATGT GGTTTTCCCGATGCAGTTAAATAAAACCTAATCTGCTAAAATT GAA
93	TAZ (GenBank 登录号 NM_000116.5)	GCTTTCGGCGGGTGCACCGGGCCGGGGTGCCAGCGCCCGCCTT CCCGTTTCTCCCGTTCGCGAGCGCGCCACGGCCTGTGACCCC GGCGACCGCTCCCAAGTACGAGAGAGCGGGGCCGGGCGCTGC TCCGGCCTGACCTGCGAAGGGACCTCGGTCCAGTCCCCTGTTGC GCCGCGCCCCCGTCCGTCCGTGCGCGGGCCAGTCAGGGGCCAG TGTCTCGAGCGGTTCGAGGTTCGACAGACCTAGAGGCGCCCCACAG GCCGCCCCGGGGCGCTGGGAGCGCCGGCCGCGGGCCGGGTGGG GATGCCTCTGCACGTGAAGTGGCCGTTCCCGCGGTGCCGCCGC TCACCTGGACCCTGGCCAGCAGCGTCGTCATGGGCTTGGTGGGC ACCTACAGCTGCTTCTGGACCAAGTACATGAACCACCTGACCGT GCACAACAGGGAGGTGCTGTACGAGCTCATCGAGAAGCGAGGC CCGGCCACGCCCTCATCACCGTGTCCAATACCAGTCTGTCAT GGACGACCCTCATCTCTGGGGGATCCTGAAACTCCGCCACATCT GGAACCTGAAGTTGATGCGTTGGACCCCTGCAGTGCAGACAT CTGCTTACCAAGGAGCTACACTCCCACCTTCTCAGCTTGGGCA AGTGTGTGCTGTGTGCCGAGGAGCAGAATTTTTCCAAGCAGA GAATGAGGGGAAAGGTGTTCTAGACACAGGCAGGCACATGCCA GGTGTGGAAGAAAGAGAGAGAAAGGAGATGGCGTCTACCAG AAGGGGATGGACTTCATTTTGGAGAAGCTCAACCATGGGGACT GGGTGCATATCTTCCAGAAAGGAAAGTGAACATGAGTTCCGA ATTCTGCGTTTCAAGTGGGGAATCGGGCGCCTGATTGCTGAGT GTCATCTCAACCCCATCATCCTGCCCTGTGGCATGTCGGAATG AATGACGTCCTTCCCTAACAGTCCGCCCTACTTCCCCCGCTTTGG ACAGAAAATCACTGTGCTGATCGGGAAGCCCTCAGTGCCTG CCTGTACTCGAGCGGCTCCGGCGGAGAACAAGTCCGCTGTGG AGATGCGGAAAGCCCTGACGGACTTCATTCAAGAGGAATTCCA GCATCTGAAGACTCAGGCAGAGCAGCTCCACAACCACCTCCAG CCTGGGAGATAGGCCTTGCTTGCTGCCTTCTGGATTCTTGGCCC GCACAGAGCTGGGGCTGAGGGATGGACTGATGCTTTTAGCTCA AACGTGGCTTTTAGACAGATTTGTTTCATAGACCCTCTCAAGTGC CCTCTCCGAGCTGGTAGGCATTCCAGCTCCTCCGTGCTTCTCA GTTACACAAAGGACCTCAGCTGCTTCTCCCACTTGGCCAAGCAG GGAGGAAGAAGCTTAGGCAGGGCTCTTTTCTTCTTGCCTTCA GATGTTCTCTCCAGGGGCTGGCTTCAGGAGGGAGCATAGAAG GCAGGTGAGCAACCAGTTGGCTAGGGGAGCAGGGGGCCACCA GAGCTGTGGAGAGGGGACCCTAAGACTCCTCGGCCTGGCTCCT ACCCACCGCCCTTGCCGAACCAGGAGCTGCTCACTACCTCTCA GGGATGGCCGTTGGCCACGCTTCTTCTGCTGAGCTTCCCC CCACCACAGGCCCTTCTCAGGCAAGGTCTGGCCTCAGGTGGG CCGAGGCGGGAAAAGCAGCCCTTGGCCAGAAGTCAAGCCAG CCACGTGGAGCCTAGAGTGAGGGCCTGAGGTCTGGCTGCTTGC CCCCATGCTGGCGCCAACAACACTTCTCCATCCTTTCCTCTCA ACATCACTGAATCCTAGGGCCTGGGTTTTCATGTTTTGAAAC AGAACCATAAAGCATATGTGTTGGCTTGTGTAATA

[0291]

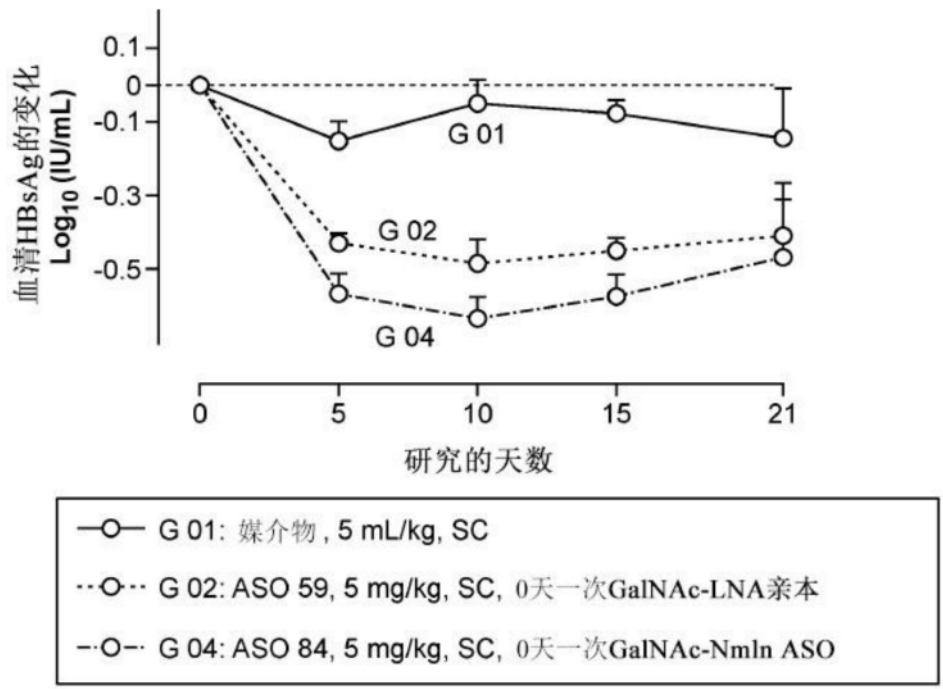
SEQ ID NO:	描述	序列
94	ANGPTL3 (GenBank 登录号 NM_014495.4)	AGAAGAAAACAGTTCACGTTGCTTGA AATTGAAAATCAAGAT AAAAATGTTTACAAATTAAGTCCTTCTTTTATTGTTCTCTAGT TATTTCTCCAGAATTGATCAAGACAATTCATCATTGATTCTCT ATCTCCAGAGCCAAAATCAAGATTTGCTATGTTAGACGATGTAA AAATTTAGCCAATGGCCTCCTTCAGTTGGGACATGGTCTTAAA GACTTTGTCCATAAGACGAAGGGCCAAATTAATGACATATTTCA AAACTCAACATATTTGATCAGTCTTTTTATGATCTATCGCTGC AAACCAGTGAAATCAAAGAAGAAGAAAAGGAACTGAGAAGAA CTACATATAAACTACAAGTCAAAAATGAAGAGGTAAAGAATAT GTCACTTGAAC TCAACTCAAACTGAAAGCCTCCTAGAAGAA AAAATTCTACTTCAACAAAAAGTGAAATATTTAGAAAGACAA TAACTAACTTAATTCAAAATCAACCTGAAACTCCAGAACACCC AGAAGTAACTTCACTTAAAACTTTGTAGAAAAACAAGATAAT AGCATCAAAGACCTTCTCCAGACCGTGAAGACCAATATAAAC AATTAACCAACAGCATAGTCAAATAAAAAGAAATAGAAAATCA GCTCAGAAGGACTAGTATTCAGAACCACAGAAAATTTCTCTAT CTTCCAAGCCAAGAGCACCAAGA ACTACTCCCTTTCTTCAGTTG AATGAAATAAGAAATGTAAAACATGATGGCATTCTCGTGAAT GTACCACCATTTATAACAGAGGTGAACATACAAGTGGCATGTA TGCCATCAGACCCAGCAACTCTCAAGTTTTTCATGTCTACTGTG ATGTTATATCAGGTAGTCCATGGACATTAATCAACATCGAATA GATGGATCACAAACTTCAATGAAACGTGGGAGAACTACAAAT ATGGTTTTGGGAGGCTTGATGGAGAATTTGGTTGGGCTAGAG AAGATATACTCCATAGTGAAGCAATCTAATTATGTTTTACGAAT TGAGTTGGAAGACTGGAAAGACAACAAACATTATATTGAATAT TCTTTTTACTTTGGGAAATCACGAAACCACTATACGCTACATCT AGTTGCGATTACTGGCAATGTCCCCAATGCAATCCCGGAAACT AAAGATTTGGTGTTTTCTACTTGGGATCACAAAGCAAAGGAC ACTTCAACTGTCCAGAGGGTTATTCAGGAGGCTGGTGGTGGCAT GATGAGTGTGGAGAAAACAACCTAAATGGTAAATATAACAAAC CAAGAGCAAATCTAAGCCAGAGAGGAGAAGAGGATTATCTTG GAAGTCTCAAATGGAAGGTTATACTCTATAAAATCAACCAA ATGTTGATCCATCCAACAGATTCAGAAAAGCTTTGAATGAACTGA GGCAAATTTAAAAGGCAATAATTTAAACATTAACCTCATTCCAA GTTAATGTGGTCTAATAATCTGGTATTAATCCTTAAGAGAAAG CTTGAGAAATAGATTTTTTTTATCTTAAAGTCACTGTCTATTAA GATTAACATACAATCACATAACCTTAAAGAATACCGTTTACAT TTCTCAATCAAATTTCTTATAATACTATTTGTTTTAAATTTTGTG ATGTGGGAATCAATTTTAGATGGTCACAATCTAGATTATAATCA ATAGGTGAACTTATTAATAACTTTTCTAAATAAAAAATTTAGA GACTTTTATTTAAAAGGCATCATATGAGCTAATATCACAACTT TCCCAGTTTAAAAA ACTAGTACTCTTGTTAAA ACTCTAAACTTG ACTAAATACAGAGGACTGGTAATTGTACAGTTCTTAAATGTTGT AGTATTAATTTCAA AACTAAAAATCGTCAGCACAGAGTATGTGT AAAAATCTGTAATACAAAATTTTAAACTGATGCTTCATTTTGT ACAAATAATTTGGAGTAAATGTTTGATATGATTTATTTATGAA ACCTAATGAAGCAGAAATTAATACTGTATTAATAAAGTTCGCT GTCTTTAAACAAATGGAGATGACTACTAAGTCACATTGACTTTA ACATGAGGTATCACTATACTTATTTGTTAAAATATATACTGTA TACATTTTATATATTTTAACTTAATACTATGAAAACAAATAA TTGTAAGGAATCTTGTCAGATTACAGTAAGAATGAACATATTT GTGGCATCGAGTTAAAGTTTATATTTCCCTAAATATGCTGTGA TTCTAATACATTCGTGTAGGTTTTCAAGTAGAAAATAAACCTCGT AACAGTTACTGAACGTTTAAACAGCCTGACAAGCATGTATAT ATGTTTTAAATTTCAATAAACAAAGACCCAGTCCCTAAATATAG AAATTTAAATTTCTTGCATGTTTATCGACATCACAAACAGATC CCTAAATCCCTAAATCCCTAAAGATTAGATACAAATTTTTTACC

[0292]

SEQ ID NO:	描述	序列
		ACAGTATCACTTGTGAGAATTTATTTTTAAATATGATTTTTTAAA ACTGCCAGTAAGAAATTTTAAATTAACCCATTTGTTAAAGGAT ATAGTGCCCAAGTTATATGGTGACCTACCTTTGTCAATACTTAG CATTATGTATTTCAAATTATCCAATATACATGTCATATATATTTT TATATGTCACATATATAAAAAGATATGTATGATCTATGTGAATCC TAAGTAAATATTTTGTCCAGAAAAGTACAAAATAATAAAGGT AAAAAATAATCTATAATTTTCAGGACCACAGACTAAGCTGTCGA AATTAACGCTGATTTTTTTAGGGCCAGAATACCAAATGGCTCC TCTCTTCCCCAAAATTGGACAATTTCAAATGCAAATAATTCAT TTATTTAATATATGAGTTGCTTCCTCTATTTGGTTCC
95	DGAT2 (GenBank 登录号 NM_001253891.1)	TGCCCCGTGTGAGGTGATAAAGTGTGCGCTCCGGGACGCCA GCGCCGCGGCTGCCGCTCTGCTGGGGTCTAGGCTGTTTCTCTC GCGCCACCCTGGCCGCCGGCCGAGCTCCAGGTGTCCTAGCC GCCCAGCCTCGACGCCGTCCCGGGACCCCTGTGCTCTGCGCGAA GCCCTGGCCCCGGGGGCCGGGGCATGGGCCAGGGGCGCGGGGT GAAGCGGCTTCCCGCGGGGCCGTGACTGGGCGGGCTTCAGCCA TGAAGACCCTCATAGCCGCTACTCCGGGGTCTGCGCGGCCGA GCGTCAGGCCGAGGCTGACCGGAGCCAGCGTCTCACGGAGGA CCTGCGCTGTCGCGCGAGGGGTCTGGGAGATGGGGAGTGGCCT GCAGTGCCATCCTCATGTACATATTCTGCACTGATTGCTGGCTC ATCGCTGTGCTCTACTTCACTTGGCTGGTGTGTTGACTGGAACAC ACCAAGAAAGGTGGCAGGAGGTCACAGTGGGTCCGAAACTGG GCTGTGTGGCGCTACTTTCGAGACTACTTCCCATCCAGCTGGT GAAGACACACAACCTGCTGACCACCAGGAACTATATCTTTGGA TACCACCCCATGGTATCATGGGCCTGGGTGCCTTCTGCAACTT CAGCACAGAGGCCACAGAAGTGAGCAAGAAGTCCCAGGCATA CGGCCTTACCTGGGTACACTGGCAGGCAACTCCGAATGCCTGT GTTGAGGGAGTACCTGATGTCTGGAGGTATCTGCCCTGTACGCC GGGACACCATAGACTATTTGCTTTCAAAGAATGGGAGTGGCAA TGCTATCATCATCGTGGTCCGGGGTGGCGCTGAGTCTCTGAGCT CCATGCCTGGCAAGAATGCAGTACCCTGCGGAACCGCAAGGG CTTTGTGAAACTGGCCCTGCGTCATGGAGCTGACCTGGTTCCCA TCTACTCCTTTGGAGAGAATGAAGTGTACAAGCAGGTGATCTTC GAGGAGGGCTCCTGGGGCCGATGGGTCCAGAAGAAGTTCAGA AATACATTGGTTTTCGCCCCATGCATCTTCCATGGTCCGAGGCCTC TTCTCCTCCGACACCTGGGGGCTGGTGCCCTACTCCAAGCCCAT CACCACTGTTGTGGGAGAGCCCATCACCATCCCCAAGTGGAG CACCAACCCAGCAAGACATCGACCTGTACCACACCATGTACA TGGAGGCCCTGGTGAAGCTCTTCGACAAGCAAGACCAAGTT CGGCCTCCCGGAGACTGAGGTCTGGAGGTGAACTGAGCCAGC CTTCCGGGCCAATTCCTGGAGGAACCAGCTGCAAATCACTTTT TTGCTCTGTAATTTGGAAGTGTATGGGTGTCTGTGGGTTATT TAAAAGAAATTATAACAATTTTGCTAAACCATTACAATGTTAGG TCTTTTTTAAGAAGGAAAAAGTCAGTATTTCAAGTTCTTTCACT TCCAGCTTGCCCTGTTCTAGGTGGTGGCTAAATCTGGGCCTAAT CTGGGTGGCTCAGCTAACCTCTCTTCTTCCCTTCCCTGAAGTGAC AAAGGAAACTCAGTCTTCTTGGGGAAAGAAGGATTGCCATTAGT GACTTGGACCAGTTAGATGATTCATTTTTGCCCTAGGGATGA GAGGCGAAAGCCACTTCTCATAACAAGCCCCTTATTGCCACTAC CCCACGCTCGTCTAGTCTGAAACTGCAGGACCAGTTTCTCTGC CAAGGGGAGGAGTTGGAGAGCACAGTTGCCCGGTTGTGTGAGG GCAGTAGTAGGCATCTGGAATGCTCCAGTTTGATCTCCCTTCTG CCACCCCTACCTCACCCCTAGTCACTCATATCGAGACCCTGGACT GGCTCCAGGATGAGGATGGGGGTGGCAATGCACACCCTGCAGG GGAAAGGACTGCCCCCATGCACCATTGCAGGAGGATGCCGC CACCATGAGCTAGGTGGAGTAACTGGTTTTTCTTGGGTGGCTGA TGACATGGATGCAGCACAGACTCAGCCTTGGCCTGGAGCACAT

[0293]

SEQ ID NO:	描述	序列
[0294]		GCTTACTGGTGGCCTCAGTTTACCTTCCCAGATCCTAGATTCT GGATGTGAGGAAGAGATCCCTCTCAGAAGGGGCCTGGCCTTC TGAGCAGCAGATTAGTTCCAAAGCAGGTGGCCCCGAACCCAA GCCTCACTTTTCTGTGCCTTCTGAGGGGGTTGGGCCGGGGAGG AAACCCAACCCTCTCTGTGTGTTCTGTTATCTCTTGATGAGATC ATTGCACCATGTCAGACTTTTGTATATGCCTTGAAAATAAATGA AAGTGAGAATCCTCTAAAAAAAAAAAAA



图